UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1949-1950 — N° 354

ACTION DES LYSATS BACTÉRIOPHAGIQUES SUR "SALMONELLA ENTERITIDIS" VAR. DANYSZ DANS L'INFECTION EXPÉRIMENTALE DE LA SOURIS ET DANS LES CULTURES

Travail du Laboratoire du Docteur R. WAHL.
(Institut Pasteur, 1948-1949.)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ
Mention « Pharmacie »

Présentée et soutenue publiquement le Vendredi 9 Juin 1950

PAR

André-Jean-Marie TERRADE

Né à Libourne (Gironde), le 24 Octobre 1924

Examinateurs de la Thèse :

MM. SIGALAS, professeur ..... *Président*
TAYEAU, professeur ..... *Juges*
PAUTRIZEL, Maître de Conférences agrégé . *Juges*
MASQUELIER, Maître de Conférences agrégé . *Juges*

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE

1950

TERRADE (André-Jean-Marie)

Action des lysats bactériophagiques sur *Salmonella enteritidis* var. Danysz dans l'infection expérimentale de la souris et dans les cultures. Travail du Laboratoire du Docteur R. Wahl (Institut Pasteur, 1948-1949). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1950. In-8°, 97 p., figure.

(Thèse Doct. Univ. Pharm. 1949-1950. N° 354.)

TERRADE (André-Jean-Marie)

Action des lysats bactériophagiques sur *Salmonella enteritidis* var. Danysz dans l'infection expérimentale de la souris et dans les cultures. Travail du Laboratoire du Docteur R. Wahl (Institut Pasteur, 1948-1949). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1950. In-8°, 97 p., figure.

(Thèse Doct. Univ. Pharm. 1949-1950. N° 354.)

TERRADE (André-Jean-Marie)

Action des lysats bactériophagiques sur *Salmonella enteritidis* var. Danysz dans l'infection expérimentale de la souris et dans les cultures. Travail du Laboratoire du Docteur R. Wahl (Institut Pasteur, 1948-1949). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1950. In-8°, 97 p., figure.

(Thèse Doct. Univ. Pharm. 1949-1950. N° 354.)

TERRADE (André-Jean-Marie)

Action des lysats bactériophagiques sur *Salmonella enteritidis* var. Danysz dans l'infection expérimentale de la souris et dans les cultures. Travail du Laboratoire du Docteur R. Wahl (Institut Pasteur, 1948-1949). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1950. In-8°, 97 p., figure.

(Thèse Doct. Univ. Pharm. 1949-1950. N° 354.)

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1949-1950 — N° 354

ACTION DES LYSATS BACTÉRIOPHAGIQUES SUR "SALMONELLA ENTERITIDIS" VAR. DANYSZ DANS L'INFECTION EXPÉRIMENTALE DE LA SOURIS ET DANS LES CULTURES

Travail du Laboratoire du Docteur R. WAHL.
(Institut Pasteur, 1948-1949.)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ
Mention « Pharmacie »

Présentée et soutenue publiquement le Vendredi 9 Juin 1950

PAR

André-Jean-Marie TERRADE

Né à Libourne (Gironde), le 24 Octobre 1924

Examinateurs de la Thèse :

MM. SIGALAS, professeur ..... *Président*
TAYEAU, professeur ..... *Juges*
PAUTRIZEL, Maître de Conférences agrégé . *Juges*
MASQUELIER, Maître de Conférences agrégé . *Juges*

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE

1950

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN HONORAIRE : M. DUPÉRIÉ.
DOYEN : M. PORTMANN. — ASSESSEUR : M. CHELLE.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. DENIGÈS, A. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PERY, LABAT, CHARRIER, DUBREUIL, MACHEBŒUF.

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	DUPÉRIÉ, CREYX
Clinique chirurgicale	PAPIN, MASSÉ
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE
Clinique gynécologique	MAGENDIE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY
Anatomie	VILLEMIN
Anatomie générale et histologie	MAYER
Hygiène et Clinique de la tuberculose	PIÉCHAUD
Médecine légale et médecine du travail	DERVILLÉE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale	REBOUL
Chimie	CHELLE
Matière médicale	GOLSE
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clinique médicale des maladies des enfants	FONTAN
Zoologie et parasitologie	SIGALAS

	MM.
Médecine expérimentale	AUBERTIN
Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	LOUBAT
Clinique des maladies infectieuses	DAMADE
Chimie biologique et médicale	N...
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ
Botanique et cryptogamie	GIRARD
Thérapeutique	BROUSTET

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. PERRENS (Maladies mentales), DUFOUR (Anatomie), MESNARD (Pharmacie), TAYEAU (Chimie biologique).

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

	MM.
Parasitologie	PAUTRIZEL
Physiologie	Mlle ROUGIER
Bactériologie	MOUSTARDIER

	MM.
Pharmacie (1re Section)	R. GOLSE
Pharmacie (2e Section)	MASQUELIER
Pharmacie (3e Section)	CAZAUX

MAITRE DE CONFÉRENCES :

Physique pharmaceutique ..... M. BLANQUET.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Médecine générale	SARIC, DUBARRY, F.-J.TRAISSAC, BERGOUIGNAN, LÉVY
Chirurgie générale	POUYANNE, LAUMONIER, CHAVANNAZ
Chimie biologique	N...
Obstétrique	MAHON, CHASTRUSSE

	MM.
Ophtalmologie	BESSIÈRE
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
Histologie	N...
Pédiatrie et puériculture	VERGER
Médecine légale et médecine du travail	L'ÉPÉE
Electro-radiologie	LACHAPÈLE
Odonto-stomatologie	MARONNEAUD
Urologie	LANGE

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	DUFOUR
Accouchements	MAHON
Puériculture	N...
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI, COUSTOU
Anatomie	RIGAUD
Chimie minérale	BABIN
Cryptogamie	LAUBIE

	MM.
Pharmacie galénique	MESNARD
Organographie et physiologie végétale	TEMPÈRE
Chimie biologique	NEUZIL
Pathologie chirurgicale	LAUMONIER, VILLAR
Zoologie pharmaceutique	BAILENGER
Hydrologie pharmaceutique	CAZAUX

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

INTRODUCTION

Depuis sa découverte par d'HERELLE, le bactériophage a été un des sujets les plus étudiés. Cependant, les problèmes qu'il pose sont loin d'être tous résolus. Son étude, comme agent thérapeutique, a fait l'objet d'un grand nombre de publications. Devant les résultats contradictoires qui ont été obtenus, nous avons voulu essayer de reprendre cette étude et de voir, dans un travail expérimental avec des conditions strictes, les résultats qu'il était possible d'obtenir (1).

Nous nous sommes adressé à l'infection de la souris par *Salmonella enteritidis*, var. DANYSZ, dont nous avons utilisé plusieurs souches sur lesquelles nous avons fait agir plusieurs races de phages.

Nos tentatives thérapeutiques ont échoué, mais elles nous ont permis de faire des remarques intéressantes sur l'évolution dans l'organisme des bactéries en présence de phages.

C'est pourquoi nous avons essayé d'approfondir le problème par une étude systématique du comportement des bactéries en présence de phages *in vivo* et *in vitro*.

Voici le plan suivi au cours de ce travail :

Dans l'historique, nous avons analysé uniquement les travaux expérimentaux, laissant de côté les innombrables essais de traitement des infections naturelles de l'Homme et des animaux.

Dans la première partie, nous avons étudié nos souches

(1) Certaines parties de ce travail ont fait l'objet de quatre publications avec le Docteur R. WAHL.

bactériennes et nos phages, indiquant en même temps les techniques utilisées pour l'entretien des souches, la préparation des phages, etc. Nous y avons joint deux chapitres concernant : l'un, nos essais pour l'établissement d'un milieu optimum pour la production de lysats d'un titre élevé, l'autre, des recherches faites dans le but de purifier et de concentrer nos préparations. Ces dernières recherches sont encore peu avancées et n'ont pas pu servir pour la purification des phages utilisés dans le présent travail.

La deuxième partie est consacrée à l'expérimentation concernant la multiplication des phages *in vivo*, chez la souris, les essais thérapeutiques, le comportement des bactéries *in vivo* en présence de phages.

Dans la troisième partie, nous étudions, pour les raisons indiquées ci-dessus, le comportement des germes dans les cultures en présence de phages.

Je tiens à remercier ici tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail : c'est un devoir agréable pour moi, d'exprimer en premier lieu ma profonde reconnaissance à M. le Docteur R. Wahl, Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur, sous la direction duquel a été fait ce travail. Il m'a toujours témoigné une constante bienveillance et n'a jamais négligé l'occasion de m'instruire. Dans ses entretiens, il m'a traité en ami plutôt qu'en élève. Qu'il veuille bien agréer l'hommage de ma bien sincère gratitude et de mon respectueux dévouement.

M. le Professeur R. Sigalas a bien voulu me faire le grand honneur de présider mon jury de thèse, je le remercie de l'intérêt qu'il m'a porté et garde de son enseignement le meilleur souvenir.

Mon camarade P. Lapeyre-Mensignac m'a beaucoup facilité la tâche en m'éclairant de ses conseils. Qu'il trouve ici l'assurance de ma sincère amitié.

Je remercie sincèrement le personnel du Laboratoire qui m'a toujours manifesté son dévouement et sa sympathie.

HISTORIQUE

La thérapeutique par le bactériophage est un sujet qui a été très controversé par les auteurs qui ont étudié ce problème. On sait que, pour d'Hérelle [18], le bactériophage fait merveille dans le choléra asiatique, la peste, la dysenterie bacillaire. Ses succès seraient moins marqués dans la fièvre typhoïde et les septicémies à staphylocoques. D'autres auteurs affirment qu'ils guérissent par le phage de nombreuses affections en foyer comme les furoncles, anthrax, ostéomyélites, etc. Le pouvoir thérapeutique du bactériophage est cependant très loin d'être reconnu par tous les auteurs. D'après Krueger et Scribner [9], qui ont fait, en 1941, une revue d'ensemble sur les usages thérapeutiques du phage, l'action lytique de celui-ci sur les bactéries serait peu vraisemblable dans l'organisme à cause des différents facteurs empêchants qu'il y rencontre. Ils admettent cependant que les lysats pourraient exercer une action favorable : 1° en provoquant des dissociations microbiennes en variantes moins pathogènes que le germe initial envahisseur; 2° en augmentant l'activité des phagocytes; 3° en apportant dans l'organisme les antigènes bactériens spécifiques mis en solution par le phage et qui provoqueraient une immunisation rapide; 4° en apportant des protéines non spécifiques qui, en provoquant un choc, déclencheraient un mécanisme d'immunité non spécifique et stimuleraient la formation d'anticorps spécifiques. Ces auteurs signalent, enfin, que les lysats peuvent être toxiques et concluent en disant que la bactériophagie *in vivo* tient une

très petite place dans les applications cliniques, et que l'action thérapeutique, quand elle existe, est dans l'ensemble non spécifique.

Nous pensons qu'avant de chercher les applications cliniques, le problème doit être étudié du point de vue expérimental. Nous allons donc passer en revue rapidement les travaux qui ont été faits en ce sens en essayant de les analyser, puis nous exposerons les moyens et le but de notre travail.

De nombreux auteurs n'ont eu que des échecs, et un certain nombre d'autres n'ont pas jugé utile de publier leurs travaux. Quelques-uns, cependant, signalent des succès; c'est sur les travaux de ces derniers que nous allons nous arrêter.

Asheshov, Wilson et Topley [1] contaminent des souris avec 100×10^6 bacilles typhiques Vi, ils divisent ces souris en trois lots : l'un sert de témoin; au deuxième lot ils injectent du phage Vi antityphique de titre $1{,}5 \times 10^9$; au troisième lot, ils injectent des phages tués par la chaleur. Seul le lot ayant reçu le phage vivant survit, ce qui prouve bien l'action lytique spécifique du phage. En employant un phage non spécifique, ils n'ont obtenu aucun succès. Ils signalent, de plus, que si l'injection du phage est faite deux heures après la contamination, l'action protectrice est beaucoup plus faible; enfin, au delà de deux heures, l'effet est nul.

Fisk [7] signale lui aussi une action protectrice dans l'infection typhoïdique expérimentale de la souris. Il injecte dans le péritoine 1 cm^3 de bacilles typhiques auquel il ajoute de la mucine. La dose mortelle étant, dans ces conditions, de 1.000 germes, il utilise pour ses essais 1.000 à 100.000 doses mortelles. Les phages employés ont été isolés de l'eau d'égout et sont probablement un mélange de plusieurs phages. L'action de ces phages est positive si on les injecte aussitôt après l'infection, son titre étant de 1×10^8. Si le titre est de 5×10^8, il y a encore une action positive

quand l'injection est faite quatre heures après l'infection. L'emploi du phage chauffé cinquante minutes à 70° est demeuré sans résultat.

Dubos, Straus et Price [6] provoquent l'infection expérimentale des souris avec *Shigella dysenteriæ,* ils font une injection intracérébrale de 0,03 cm³ de culture de ce bacille et provoquent ainsi la mort des animaux qui succombent à une méningite en trois à dix jours. Des phages sont isolés de l'eau d'égout. La préparation n'est pas purifiée et donne au moins deux sortes de plages, et son titre est de 7×10^9 à 2×10^{10} par cm³. Ces auteurs constatent d'abord une multiplication *in vivo* dans le cerveau et dans le sang, celle-ci étant meilleure dans le premier cas. Ils signalent que l'élimination du phage est rapide et qu'après quatre jours on n'en retrouve plus. L'expérience porte sur trois lots de huit souris : un lot comprend les témoins qui succombent tous; le deuxième lot reçoit du phage de titre 10^9 par cm³ : deux souris seulement meurent; le troisième lot reçoit du phage de titre 10^5 : six souris meurent. Les auteurs injectent le phage et les germes en même temps, ils obtiennent 72 p. 100 de guérison quand le phage est injecté par voie intrapéritonéale; ils signalent des résultats positifs quand le phage est injecté par voie intraveineuse ou sous-cutanée. Les résultats sont négatifs si le phage est administré *per os.* Ils concluent en disant que le phage se multiplie *in vivo* et que le succès du traitement dépend du titre élevé du phage.

Morton, Engley et Frank [13] ont expérimenté avec *Shigella para-dysenteriæ* Flexner. Une suspension de quatre bacilles avec 5 p. 100 de mucine constitue la dose minima mortelle pour la souris. Ils utilisent un phage dysentérique actif et multiplié sur leur germe ayant un titre de 1×10^3 par cm³. Le phage protège les souris contre 10.000 doses mortelles, s'il est injecté sept jours avant l'infection. Dans les mêmes conditions, un phage tué par la chaleur n'a aucune action. L'action du phage est positive

si on l'injecte simultanément avec les bactéries par voie intrapéritonéale, et on a une protection contre 12.000 doses mortelles. Si le phage est injecté six heures après les germes, l'action est nulle.

Morton et Perez-Otero [12] signalent, dans leurs travaux sur le comportement du phage *in vivo*, une multiplication de celui-ci dans le sang, et disent que l'on peut encore l'y détecter après cinq ou sept jours. L'action protectrice du phage serait due, d'après eux, à son action lytique.

Walter E. Ward [37], enfin, a fait lui aussi un travail intéressant et obtenu des résultats positifs. Les conditions expérimentales sont les suivantes : l'infection est provoquée par l'injection intrapéritonéale de 10 à 100 bacilles typhiques Vi dans 4 p. 100 de mucine. Le phage est injecté par voie intraveineuse. Jusqu'à une concentration de phage de 10^5, les résultats sont positifs; si la concentration est de 10^4, il y a 60 p. 100 de morts; enfin, si le titre n'est que de 10^3, il y a 100 p. 100 de morts. L'auteur retrouve des germes dans le sang une heure après l'infection; il protège 90 p. 100 des souris en injectant le phage par voie intraveineuse, quatre heures après l'infection. Les résultats sont négatifs si l'injection de phage est plus tardive ou si l'on emploie du phage non spécifique. Lorsque l'on emploie du phage spécifique, le phage se retrouve dans le sang après soixante heures. Si le phage n'est pas spécifique, il disparaît très vite. Enfin, chez les souris traitées et guéries, Ward retrouve des germes non pathogènes.

La critique que nous pouvons adresser à ces travaux est que les différents auteurs ont utilisé des germes peu pathogènes pour la souris. Les auteurs ont dû utiliser des artifices (adjonction de mucine aux germes ou introduction de ceux-ci par voie intracérébrale) pour tuer leurs animaux; on ne peut donc pas tirer un enseignement pratique de ces expériences. Cependant, certaines conclusions paraissent s'imposer. Les phages ne sont actifs que s'ils sont employés à une concentration suffisamment élevée et introduits très

peu de temps après l'injection contaminante. Quant à l'action prophylactique, il semble difficile de l'attribuer aux phages eux-mêmes; il s'agit probablement d'immunisation par d'autres composants du lysat. Quoi qu'il en soit, le bactériophage ne peut présenter un intérêt thérapeutique que s'il est capable d'enrayer une maladie spécifique en étant employé au moment où celle-ci se déclare, c'est-à-dire après la période d'incubation. C'est guidé par cette idée que nous avons décidé de nous adresser à *Salmonella enteritidis*, var. Danysz, germe très pathogène pour la souris et donnant chez elle une infection très spécifique et toujours mortelle.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DES SOUCHES BACTÉRIENNES ET DES PHAGES

CHAPITRE PREMIER

Etude des souches

Origine

Nous avons travaillé avec quatre souches différentes de *Salmonella* Danysz qui nous ont été fournies en gélose profonde par le Service des vaccins de l'Institut Pasteur (1). Nous nous sommes rapidement rendu compte que ces souches différaient par plusieurs caractères, en particulier par leur comportement envers les phages et par leur pouvoir pathogène, comme nous le verrons par la suite. Nous désignerons ces souches de la façon suivante : *a)* la souche X sur laquelle nous avons étudié la toxicité des lysats, et que nous avons perdue par la suite; *b)* la souche 0 que nous avons entretenue un certain temps puis qui a été transformée par des mutations; *c)* la souche I qui, à l'origine, était contaminée par le phage D 5 A, dont nous l'avons débarrassée; *d)* la souche II au pouvoir pathogène élevé, qui nous a servi dans nos essais thérapeutiques.

(1) Nous remercions le Docteur Le Minor qui nous a donné ces souches.

Conservation, entretien, mode d'utilisation

Nous avons constitué un stock en gélose profonde, conservé à la glacière, à partir duquel nous partions chaque mois pour faire nos repiquages. Nous avons rapidement abandonné le mode d'entretien en milieu liquide, et en particulier en milieu synthétique, à cause des mutations que subissent les souches, surtout quant à leurs réactions envers les phages. Nous nous sommes arrêté à la technique d'entretien suivante :

A partir du stock conservé à la glacière, nous effectuons un repiquage sur gélose inclinée, à partir duquel nous partons pour faire nos repiquages journaliers sur gélose inclinée. Nous avons eu besoin, dans notre travail, d'utiliser les germes en milieu liquide et à des taux connus. Nous avons fait, pour cela, des suspensions en eau physiologique que nous avons étalonnées au photomètre, à 200 millions et 400 millions de germes par cm^3. Ces étalons ont été conservés en présence d'une goutte de formol par cm^3, et en tubes scellés; nous les avons renouvelés tous les mois.

Les suspensions utilisées pour nos expériences ont été faites comparativement aux étalons en eau physiologique, et à partir des cultures sur gélose inclinée ayant dix-huit heures d'étuve à 37°. Pour effectuer des dilutions, nous avons utilisé l'eau physiologique ou l'eau peptonée (10 cm^3 par tube) et la pipette calibrée à XXX gouttes par cm^3. L'exactitude des différentes dilutions employées a été vérifiée plusieurs fois par étalement d'un volume connu sur boîte de Pétri et numération des colonies.

Comportement des phages vis-a-vis des différentes souches

Nous allons étudier l'influence des différentes souches sur les phages à divers points de vue qui nous ont paru intéressants. En effet, les caractères des phages varient avec la souche sur laquelle ils ont été multipliés.

1° Le taux et le temps de multiplication des phages sont variables selon les souches. Dans les mêmes conditions, le phage D 4 multiplié sur la souche I possède un titre de 3×10^8 par cm^3; multiplié sur la souche II, le titre n'est que de $1{,}2 \times 10^8$. Le phage D 5, au contraire, possède, multiplié sur la souche II, un titre de $1{,}2 \times 10^8$, alors que multiplié sur la souche I le titre est de 6×10^6 par cm^3.

2° L'aspect des plages avec le même phage est différent selon les souches. Ainsi, le phage D 4 multiplié sur la souche I donne, si on l'étale sur cette dernière souche, des plages moyennes et bien percées, alors que ce même phage étalé sur la souche II donne de grandes plages entourées d'une auréole.

Le même phage D 4 multiplié sur la souche II donne, étalé sur celle-ci, des phages de deux types différents : plages petites et grandes plages avec auréole sans que l'on ait affaire à un mélange de phages. Ce même phage, étalé sur la souche I, ne donne que des plages moyennes et bien percées.

3° Enfin, le titre d'un même phage varie suivant que le titrage est fait sur telle ou telle souche. Ainsi, un phage D 4 multiplié sur la souche I et titré simultanément sur les souches I, II et 0, donne, sur la souche 0, dix fois moins de plages que sur la souche I et, sur la souche II, trois fois moins de plages que sur la souche I. C'est, en effet, sur la souche qui a servi à la préparation du lysat que le titre est généralement le meilleur. Un phage D 4, par exemple, multiplié sur la souche II, a sur cette souche un titre de $1{,}5 \times 10^8$; sur la souche 0, un titre de $1{,}8 \times 10^8$ et, sur la souche I, un titre de $1{,}5 \times 10^5$.

R. Wahl et L. Blum-Emerique [31] ont observé des modifications dans le nombre, les dimensions et l'aspect des plages du bactériophage S 13, ainsi que dans la fixation et la multiplication des phages, suivant les mutations d'une souche sensible de *Shigella paradysenteriæ*, et les ont attribués à l'existence de mutants « semi-résistants ».

Nous pensons qu'il s'agit ici d'un cas analogue et que chaque souche est constituée par un mélange variable de germes sensibles et semi-résistants; la fixation et la multiplication des phages sur chaque souche différant suivant les germes qui le composent. Dans les souches en cours de mutation, on observe des caractères intermédiaires. Ceci explique l'aspect différent des plages et les variations de titre selon les souches.

Mutations

Nombre de repiquages. Progression des mutations. Coexistence de différents types de plages.

Nous avons déjà dit que les repiquages, en milieu liquide, des différentes souches, favorisaient les mutations rapides. Les mutations sont beaucoup plus lentes avec les repiquages sur gélose, nous en avons pourtant constaté au bout de quelques mois. Les caractères des mutants ont été seulement observés à un double point de vue : le pouvoir pathogène et les réactions aux phages. Pour la souche 0, par exemple, le pouvoir pathogène était tel que l'on provoquait la mort de la souris en six à huit jours avec 200 germes administrés par voie intrapéritonéale; il nous a fallu par la suite administrer des doses plus importantes de germes, de l'ordre de 1.000 à 2.000, pour observer la mort dans le même laps de temps. Le second point intéressant est que nous avons vu l'aspect des plages du phage D 4, sur la souche, varier au fur et à mesure des mutations chez celle-ci. Initialement, ce phage donnait, sur la souche 0, des plages moyennes et bien percées, puis, au bout d'un certain temps, un mélange de plages moyennes et de grandes plages avec auréole; ensuite, seulement, des grandes plages avec auréole. Il s'agissait toujours du même phage, ce que nous avons prouvé en faisant des prélèvements sur des plages différentes : à partir de chacun, on obtenait toujours, sur un nouvel étalement, les deux types de plages. R. Wahl et

L. Blum-Emerique ont montré que l'aspect des plages du phage S 13 sur la souche Y 6 R est fonction du degré des mutations dans la souche. Nous observons ici le même phénomène.

Pouvoir pathogène des différentes souches

Etudié plus loin avec la symptomatologie de l'infection.

CHAPITRE II

Etude des phages

Origine

Nous avons utilisé un certain nombre de phages de la collection du laboratoire, isolés par M. Wahl sur bacille de Danysz à partir de l'eau d'égout, selon la technique habituelle. Nous avons retenu deux de ces phages : le D 4 et le D 5. D'un autre côté, la souche I nous ayant été fournie contaminée par un phage, nous avons isolé celui-ci et l'avons appelé D 5 A. Enfin, après avoir essayé les différents phages actifs sur la souche E coli 2 de la série utilisée par les auteurs américains, et dont on trouvera les caractères notamment dans une publication de Delbrück [5 bis], nous avons retenu le T 5 et nous l'avons fait multiplier sur nos souches.

Les caractères des phages diffèrent suivant la souche sur laquelle ils ont été multipliés. Aussi, désignerons-nous les préparations utilisées en faisant suivre le nom du phage du numéro de la souche qui a servi à l'entretenir, par exemple : D 4/II, T 5/0.

Titrage des phages

Les titrages sont effectués, suivant la méthode utilisée au laboratoire, par dilution du lysat à 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}, etc., dans des tubes contenant 10 cm^3 d'eau bidistillée stérile, à l'aide de pipettes calibrées, stériles, dont III gouttes correspondent

à 1/10e de cm³. Ces titrages sont faits, soit à la goutte aux dilutions indiquées, soit par étalement complet sur une boîte de Pétri, de 1 goutte de la dilution où les plages sont comptables. Nos fonds de boîtes sont faits par étalement de IV gouttes d'une suspension de germes en eau physiologique titrant 1 milliard par cm³ environ. Le milieu utilisé pour les titrages est l'eau peptonée gélosée; elle contient, par litre, 30 g. de peptone Uclaf, 6 g. de ClNa et 15 g. de gélose. Le milieu est coulé, après liquéfaction au bain-marie, en boîtes de Pétri de 10 centimètres de diamètre, placées sur un plan horizontal, à raison de 30 cm³ par boîte. Après la prise de la gélose, les boîtes sont renversées et laissées quarante-huit heures à l'étuve à 37°, les boîtes sont utilisées dans les vingt-quatre heures qui suivent.

Préparation du sérum antiphage

Un lysat bactériophagique a été préparé avec la souche 0 et le phage D 4; son titre était de 6×10^8 phages par cm³. Nous avons d'abord fait à un lapin quatre injections intrapéritonéales de lysat, à raison d'une injection tous les trois jours. Après la quatrième injection, le taux des anticorps antiphages était pratiquement nul. Nous avons alors laissé reposer ce lapin pendant un mois, puis nous lui avons fait huit injections intraveineuses de phages, à raison d'une tous les deux jours. Nous avons saigné le lapin après quatre jours de repos et nous avons obtenu un sérum qui neutralisait 99 p. 100 des phages D 4 à la dilution 1/1.200e. Ce sérum a été mis en ampoules de 1 cm³ et conservé à la glacière. N'ayant pas préparé de sérum anti-T 5, nous avons essayé ce même sérum sur ce phage qui est neutralisé au 1/25e, ce qui nous a permis de l'utiliser dans nos expériences faites avec le T 5.

Préparation de lysats de titre élevé

Nous avons étudié les conditions de préparation des lysats et nous avons constaté que, pour obtenir un titre

élevé, il fallait opérer différemment suivant les souches et suivant les phages. Cependant, on peut obtenir des lysats ayant un bon titre avec des proportions assez variables de phages et de germes. Pour déterminer les conditions optima, nous avons fait des essais systématiques et nous avons pu ainsi adopter une technique un peu différente pour chaque phage et chaque souche. A titre d'exemple, nous allons citer notre expérience faite avec le phage D 4 sur la souche I.

Nous avons opéré sur 10 cm³ de notre milieu (voir chapitre III) contenu dans les ballons Kjeldahl; nous avons ensemencé largement en faisant directement, dans le milieu, une suspension de germes à partir d'une culture sur gélose inclinée ayant dix-huit heures d'étuve. Après une demi-heure au bain-marie à agitation à 37°, on inocule le phage. Après cinq heures environ, la lyse est rarement totale, mais le milieu s'est éclairci et les débris de germes forment des agglutinats au sein du liquide, c'est à ce moment là que l'on effectue le titrage.

N°s DES BALLONS	GERMES PAR CM³	PHAGES PAR CM³	TITRE PAR CM³
1	800 millions	500.000	$8{,}4 \times 10^8$
2	— —	5.000	$1{,}8 \times 10^7$
3	400 —	500.000	$1{,}2 \times 10^8$
4	— —	5.000	$4{,}8 \times 10^9$
5	200 —	500.000	$2{,}1 \times 10^8$
6	— —	5.000	$2{,}7 \times 10^8$

Pour obtenir le phage D 4/I, nous ensemençons donc en effectuant, au sein du milieu, une suspension à 400 millions de germes par cm³ et, après demi-heure au bain-marie à agitation, nous inoculons le phage dans la proportion de 5.000 par cm³.

Le phage D 4/II est préparé dans les mêmes conditions

en ensemençant le milieu avec 400 millions de germes de la souche II par cm^3, et en inoculant le phage après une demi-heure, à raison de 10.000 par cm^3.

Le phage D 5/I est préparé en ensemençant le milieu avec 200 millions de germes de la souche I et en inoculant, après une demi-heure, le phage à raison de 100.000 par cm^3.

Le phage D 5/II est préparé en ensemençant le milieu avec 200 millions de germes de la souche I par cm^3, et en inoculant 50.000 phages par cm^3 après une demi-heure.

Le phage T 5/I est préparé avec la souche I ensemencée à raison de 200 millions par cm^3, et on inocule, après une demi-heure, 100.000 phages par cm^3.

Les phages T 5/II et T 5/0 sont préparés dans un milieu ensemencé avec 200 millions de germes par cm^3, dans lequel on inocule, après une demi-heure, 50.000 phages par cm^3.

Ces deux derniers phages donnent, sur leurs souches respectives, un mélange à peu près égal de grandes et de petites plages. Nous avons récupéré séparément ces deux sortes de plages et nous avons constaté que nous avions affaire à un mélange de deux phages; le phage à grandes plages a toujours donné des grandes plages, et le phage à petites plages toujours des petites plages. Toutes les expériences ont été faites avec ce mélange.

Les phages D 5 A/I et D 5 A/II sont préparés en ensemençant le milieu avec 200 millions de germes, et le phage est inoculé après une demi-heure, à raison de 20.000 par cm^3. Nous voyons par ce qui précède que les conditions de préparations des lysats sont variables selon les phages et les souches; nous avons indiqué les proportions et les conditions approximatives, celles-ci sont en effet assez variables, et nous avons souvent obtenu des lysats de même titre préparés dans des conditions différentes. Le titre de nos différents phages est toujours supérieur à 10^8 par cm^3, et peut être beaucoup plus élevé pour certains d'entre eux : le D 4/I, par exemple, qui peut atteindre 10^{10}.

Clarification des lysats

Le plus souvent, nous préparons 100 cm³ de lysat de chaque phage pour en avoir un stock important. Ces lysats doivent être clairs, stériles et de conservation facile. Nous avons, dans ce but, adopté un traitement standard que nous leur faisons subir. Après la lyse, nous faisons un premier titrage pour voir si nous ne perdons pas de phages par la suite; ce titrage est effectué après une première centrifugation de dix minutes pour débarrasser le lysat de la plus grande partie des germes et débris microbiens. Mais la centrifugation ne suffit pas à clarifier les lysats, et nous y ajoutons l'adsorption des impuretés sur phosphate de calcium, d'après la technique de R. Wahl et L. Blum-Emerique [25 et 26], avec certaines modifications.

Le lysat est alcalinisé à *p*H 7,8 avec 0,50 g. p. 100 de CO_3Na_2 cristallisé environ. Après dissolution, on forme un précipité de phosphate de calcium par addition de 10 cm³ p. 100 de solution stérile de $CaCl_2$ à 4 p. 100; après quinze minutes de repos à la glacière, on centrifuge cinq minutes. On obtient ainsi un lysat très clair mais non stérile.

Stérilisation et conservation

On fait alors une filtration sur bougie L 3 avec une dépression n'excédant pas 20 cm. de mercure, le lysat étant alcalin aux environs de *p*H 7,8; la bougie, dans ces conditions, ne retient pas de phages, comme nous le constatons en faisant un deuxième titrage. Nos différents lysats sont ensuite conservés à la glacière en présence d'un cristal de thymol (R. Wahl et L. Blum-Emerique [29]), pour éviter les contaminations, et sont prêts à être utilisés. En opérant dans ces conditions, nous avons constaté, en ensemençant des tubes d'eau peptonée, que nos lysats restaient stériles.

Étude comparative des phages D 4 et T 5

Nous avons pensé qu'il serait intéressant, dans ce chapitre, de faire une étude comparative des phages D 4 et T 5 avec lesquels nous avons surtout travaillé. Nous avons vu plus haut les différentes sortes de plages que ces phages donnent sur les différentes souches. Nous allons voir que ces deux phages sont très différents à divers points de vue :

a) Action du sérum anti-D 4 : il neutralise ce phage au 1/200e, alors que le phage T 5 n'est neutralisé qu'au 1/25e.

b) Pouvoir de lyse et titre sur les différentes souches :

Sur la souche I : D 4 lyse une grande quantité de germes et atteint le titre de 3×10^9; T 5 lyse peu de germes et atteint le titre de $1{,}2 \times 10^7$.

Sur la souche II : D 4 lyse une assez grande quantité de germes et atteint le titre de $1{,}2 \times 10^9$; T 5 lyse moins de germes et atteint le titre de $1{,}5 \times 10^8$ (1).

c) Nous verrons plus loin que l'action stérilisante et le nombre de résistants donnés par ces deux phages sont aussi très différents. Le phage D 4, en effet, donne beaucoup de résistants et son action stérilisante est faible. Le phage T 5, au contraire, a une action stérilisante appréciable et donne peu de mutants résistants.

(1) Ces chiffres se rapportent à des exemples particuliers et varient avec les conditions de préparations des lysats.

CHAPITRE III

Etude de la composition du milieu pour la production optima du phage D 4 sur S. Danysz

Nous sommes partis d'un milieu synthétique de base de composition connue (R. Wahl et L. Blum-Emerique [31]), et constitué par un mélange de trois solutions. La première est ainsi composée :

Chlorure de potassium	0,50 g.
Sulfate d'ammonium	0,75 g.
Sulfate de magnésium	0,05 g.
Acide nicotinique	0,01 g.
Eau bidistillée	q. s. p. 100 cm^3.

A cette première solution on ajoute 7,5 cm^3 pour 100 cm^3 d'une solution de glucose à 30 p. 100 stérilisée à part.

On ajoute ensuite 10 cm^3 d'une solution de phosphate, tamponnée à *p*H 7,6, de formule :

Phosphate disodique, 12 H^2O ..	R. P.....	19,95 g.
Phosphate monopotassique ..	Merck...	0,45 g.
Eau bidistillée		100 cm^3

Dans le milieu synthétique ainsi préparé, notre germe pousse très bien. Nos essais sont pratiqués sur 10 cm^3 de ce milieu auquel on ajoute III gouttes de solution de $CaCl_2$ à 0,4 p. 100 correspondant à la concentration optima d'ion calcium pour la multiplication de nos phages. R. Wahl [24, 28] a montré, en effet, qu'il existe pour chaque phage une concentration optima de cet ion.

Nous avons cherché à compléter ce milieu de base pour le rendre plus favorable à la multiplication de nos phages.

En pratiquant des passages en bouillon, eau peptonée et milieu à l'hydrolysat de caséine (préparation de GLADSTONE et FILDES [8]) auxquels nous ajoutons VI gouttes de glucose à 30 p. 100 et III gouttes de $CaCl_2$ à 0,4 p. 100 pour 100 cm³, nous obtenons approximativement le même titre dans les trois cas. Des passages comparatifs en milieu à l'hydrolysat de caséine et en milieu synthétique nous ont montré que ce dernier n'est pas assez riche pour un rendement optimum en phages. Les différences sont de l'ordre suivant :

1er essai	milieu à l'hydrolysat	$1{,}8 \times 10^9$
	milieu synthétique	$1{,}7 \times 10^7$
2e essai	milieu à l'hydrolysat	$3{,}6 \times 10^9$
	milieu synthétique	$1{,}8 \times 10^8$

D'après ce premier résultat, nous avons introduit dans notre milieu synthétique de base des hydrolysats de caséine préparés selon la technique de GLADSTONE et FILDES.

On prépare la solution suivante dont on introduit des quantités variées :

Hydrolysat trypsique	3 cm³
Hydrolysat acide	7,5 cm³
Eau bidistillée	180 cm³

Nous avons déterminé qu'il suffit de XX gouttes de cette solution pour 10 cm³ de milieu synthétique, pour obtenir un bon rendement.

Des expériences comparatives faites avec le mélange des deux hydrolysats et l'hydrolysat acide seul nous ont prouvé que ce dernier contenait tous les éléments nécessaires à la croissance du phage, l'hydrolysat trypsique n'ayant aucune action améliorante. Nous avons donc finalement utilisé l'hydrolysat acide seul à la concentration indiquée ci-dessus.

Les conditions dans lesquelles ont été faites les expériences qui vont suivre sont celles-ci : 10 cm³ de milieu

sont ensemencés avec VIII gouttes d'une suspension de germes contenant 200 millions par cm^3. Les expériences sont faites dans des petits ballons Kjeldahl qui sont placés au bain-marie à agitation à 37° pendant une heure quinze; à ce moment, on inocule dans chacun la même quantité de phage, soit III gouttes d'une dilution à 10^{-2} d'un phage titrant 50 plages à 10^{-4}. Nous pratiquons les titrages cinq heures après.

Dans ces conditions expérimentales, nous avons pratiqué deux séries d'essais :

1° Au milieu contenant de l'hydrolysat de caséine, nous avons ajouté des substances qui auraient la possibilité d'augmenter le rendement en phages. Ces éléments sont les suivants :

Le tryptophane, qui est absent de l'hydrolysat; nous l'avons employé en solution M/40, de même la glutamine en solution à 0,50 g. p. 1.000. Les ions Fe et Mn entrant souvent dans les divers processus enzymatiques, nous avons fait une solution de $(SO_4)_3Fe_2$ à 1 p. 1.000 et de Cl_2Mn à 1 p. 1.000. Nous avons, de plus, essayé l'eau de levure conservée sous $CHCl_3$, qui est très riche en vitamines. (Préparation d'après Gladstone et Fildes [8].)

Expérience :

Tube n° 1 milieu synthétique.

— 2 — — + XX gouttes hydrolysat.
— 3 — — + XX — —
+ III — tryptophane.
— 4 — — + X — eau de levure.
— 5 — — + III — glutamine.
— 6 — — + II — Cl_2Mn.
— 7 — — + II — $(SO_4)_3Fe_2$.

Résultats :

Tube n° 1 ..... $1{,}8 \times 10^5$
— 2 ..... 3×10^7
— 3 ..... $1{,}5 \times 10^8$

Tube n° 4 ..... $1{,}5 \times 10^{6}$
— 5 ..... $1{,}5 \times 10^{8}$
— 6 ..... $1{,}5 \times 10^{8}$
— 7 ..... $1{,}5 \times 10^{8}$

Cette expérience a été faite deux fois en donnant des résultats analogues. Il en ressort que la présence de l'eau de levure paraît diminuer le rendement, le rôle des ions Fe et Mn, ainsi que celui de la glutamine sont nuls. Quant à l'hydrolysat, il augmente considérablement le rendement en phages par rapport au milieu synthétique seul, même quand on n'en ajoute qu'une petite quantité qui est ici de l'ordre de XX gouttes pour 10 cm³. Le rôle favorable du tryptophane se montre d'une façon indéniable.

Nous avons établi la composition du milieu que nous employons d'après les résultats de ces expériences.

2° Dans une deuxième série d'essais, nous avons cherché à remplacer l'hydrolysat de caséine par une solution contenant un ou plusieurs aminoacides. Nous avons fait avec chacun de ceux que nous avions à notre disposition une solution M/20 et nous les avons répartis en trois groupes après mélange de toutes les solutions à parties égales.

1	2	3
Asparagine	Tyrosine	Méthionine
Glycocolle	Phénylalanine	Ornithine
Alanine	Tryptophane	Cystéine
Leucine	Proline	
Isoleucine	Hydroxyproline	
Sérine	Histidine	
Thréonine		

Expérience :

Tube n° 1 milieu synthétique + XV gouttes de 1
— 2 — — + XV — de 2
— 3 — — + XV — de 3

Tube n° 4 milieu synthétique { + X gouttes de 1 / + X — de 2 / + X — de 3

Tube n° 5 milieu synthétique { + XX gouttes hydrolysat / + III — tryptophane.

Résultats :

Tube n°	1	$7{,}5 \times 10^3$
—	2	6×10^4
—	3	6×10^4
—	4	$2{,}4 \times 10^5$
—	5	6×10^7

L'hydrolysat n'est pas remplaçable par les quelques amino-acides que nous avons utilisés. L'action améliorante du tryptophane est elle-même masquée dans le mélange n° 2, celle-ci ne se manifeste qu'en présence d'hydrolysat. Un grand nombre d'amino-acides doit être nécessaire au phage (comme le laissent supposer les résultats du tube n° 4) auxquels doivent s'ajouter peut-être des facteurs mal connus contenus dans l'hydrolysat.

Les résultats précédents nous ont permis d'adopter des phages préparés dans le milieu synthétique dont nous avons indiqué la formule, auquel nous avons ajouté 20 p. 100 de la solution d'hydrolysat acide de caséine (7,5 cm^3 d'hydrolysat pour 180 cm^3 d'eau bidistillée) et 3 cm^3 p. 100 d'une solution de tryptophane M/40.

CHAPITRE IV

Essais de purification et de concentration des phages

Dans le chapitre II de la seconde partie, nous verrons que la méthode de R. Wahl et L. Blum-Emerique *(de précipitation par l'alcool)* ne pouvait être appliquée à nos phages, parce qu'elle aboutissait à la concentration d'une toxine.

Nous avons essayé diverses autres techniques que nous allons exposer, et dont la dernière nous paraît donner des résultats encourageants.

Purification par le $SO_4(NH_4)_2$

Nous avons entrepris de concentrer les phages par le $SO_4(NH_4)_2$ et essayé de voir si l'on peut, en même temps, se débarrasser de la toxine.

Technique. — Le lysat, après alcalinisation à *p*H 7,8 par CO_3Na_2 cristallisé et centrifugation, est traité par $CaCl_2$ à 4 p. 100 et centrifugé à nouveau. Après cette première purification, nous avons employé le $SO_4(NH_4)_2$ à trois doses différentes :

a) Avec 25 g. p. 100 de $SO_4(NH_4)_2$, le précipité étant repris par 1/10^e du volume initial d'eau physiologique, la

proportion des phages est de 2 dans le surnageant pour 3 dans le précipité;

b) Avec 40 g. p. 100 de $SO_4(NH_4)_2$ la proportion, dans les mêmes conditions, est de 1 dans le surnageant pour 4 dans le précipité;

c) Avec $SO_4(NH_4)_2$ à saturation, la proportion est de 1 dans le surnageant pour 5 dans le précipité.

C'est donc par le $SO_4(NH_4)_2$ à saturation que l'on précipite le plus complètement les phages.

Signalons que, dans ces deux dernières conditions, le précipité, après centrifugation, reste en surface à cause de la densité du milieu; nous décantons, dans ce cas, le liquide clair à la pipette.

Nous avons effectué nos expériences avec le $SO_4(NH_4)_2$ à saturation. Le lysat, après la première purification par le phosphate de calcium (1), est traité par $SO_4(NH_4)_2$ jusqu'à léger excès. On centrifuge dix minutes et on décante le liquide clair. Celui-ci est dialysé pendant douze heures sous légère pression, contre eau distillée, puis on lui fait subir une précipitation par l'alcool à $-15°$. Le précipité est repris par 1/10e de son volume de solution tampon de *p*H 6,8 après lavage à l'éther. On injecte quatre souris avec ce liquide : deux reçoivent 1 cm^3, et deux 1/2 cm^3. Les quatre souris meurent en quinze minutes. La toxine est donc restée dans le liquide clair. Le précipité dû au $SO_4(NH_4)_2$ est à son tour repris par 1/10e du volume initial de solution tampon de *p*H 6,8 et, après centrifugation pour éliminer les impuretés, on dialyse douze heures sous pression contre eau distillée. Quatre souris sont injectées avec ce liquide : deux reçoivent 1 cm^3, et deux 2 cm^3. Les quatre souris survivent.

Nous pouvons donc conclure qu'en traitant un lysat par le $SO_4(NH_4)_2$ à saturation, on peut, d'une part, concentrer les phages dans une proportion de 1 à 5 et, d'autre part, se

(1) Suivant la technique de R. Wahl et de ses collaborateurs [25].

débarrasser de la toxine qui, n'étant pas entraînée dans le précipité, reste dans le liquide clair. Malgré ces avantages, ce procédé nécessite un grand nombre de manipulations assez délicates, c'est pourquoi nous avons essayé d'autres méthodes.

Purification par l'alumine

La préparation d'alumine utilisée est celle que Willstätter a indiquée pour l'alumine G. Après une première purification par le phosphate de calcium, on alcalinise le lysat par CO_3Na_2 jusqu'à *p*H 8; dans ces conditions, en milieu alcalin, l'alumine n'adsorbe pas de phages. On traite ensuite par l'alumine à 10 p. 100 et, après agitation et repos de quinze minutes à la glacière, on centrifuge pendant cinq minutes. Le liquide surnageant qui contient tous les phages est soumis à une concentration par l'alcool à 1 p. 10. Quatre souris sont ensuite injectées avec 1 cm^3 sans présenter aucun symptôme toxique.

Adsorption sur phosphate de calcium suivie d'élution

En étudiant la courbe d'adsorption des phages sur un précipité de phosphate de calcium, R. Wahl, P. Grabar et L. Blum-Emerique [26] ont remarqué que l'adsorption des phages sur les précipités de phosphate de calcium dépendait du *p*H. L'étude de cette courbe d'adsorption est à la base de la méthode que nous avons étudiée avec R. Wahl [34].

Courbe d'adsorption des phages. — Les lysats sont préparés selon la technique habituelle puis centrifugés pour éliminer les grosses impuretés et les débris microbiens. Si nous prenons à ce moment les *p*H de différents lysats, nous constatons qu'ils sont souvent très variables. Les milieux utilisés étant identiques, nous devons soupçonner l'influence des souches bactériennes et du nombre de germes qui ont poussé avant d'être lysés. Le milieu que nous utilisons contient environ 20 g. p. 1.000 de phosphates; le précipité

de phosphate de calcium est formé en ajoutant au lysat une solution stérile de $CaCl_2$ à 4 p. 100. Pour faire l'étude de l'adsorption, nous avons procédé de la façon suivante : 200 cm³ d'un même lysat ont été divisés en dix portions de 20 cm³. Nous avons ajouté à chaque échantillon de lysat des quantités croissantes de la solution de $CaCl_2$, soit 0,5 cm³, 1 cm³, 1,5 cm³ jusqu'à 5 cm³ pour 20. Après agitation, les flacons sont placés à la glacière pendant quinze minutes puis centrifugés. On décante ensuite le liquide surnageant, on ne prend le *p*H et on effectue un titrage de phages. Nous avons effectué un assez grand nombre d'expériences de ce type; nous allons donner ici les résultats de deux d'entre elles et voir quelle est la loi de l'adsorption.

1° Expérience faite avec 200 cm³ de phage D 4/2 :
Titre initial : 3×10^8 par cm³.
*p*H initial : 7,45.
Chaque essai est pratiqué sur 20 cm³ de lysat.

N°s	$CaCl_2$ à 4 p. 100 (en cm³)	*p*H du surnageant	Titre du surnageant
1	0,5	7,10	3×10^8
2	1	7,03	3×10^8
3	1,5	6,89	3×10^8
4	2	6,65	3×10^8
5	2,5	6,16	$1,5 \times 10^7$
6	3	6,10	$2,1 \times 10^6$
7	3,5	5,93	$4,5 \times 10^5$
8	4	5,75	$3,6 \times 10^5$
9	4,5	5,55	9×10^4
10	5	5,40	$4,5 \times 10^3$

2° Expérience faite avec 200 cm³ de phage D 4/1 :
Titre initial : $4,5 \times 10^8$ par cm³.
*p*H initial : 6,91.
Chaque essai est pratiqué sur 20 cm³ de lysat,

N°s	$CaCl_2$ à 4 p. 100 (en cm^3)	*p*H du surnageant	Titre du surnageant
1	0,5	6,80	$4,5 \times 10^8$
2	1	6,58	$4,5 \times 10^8$
3	1,5	6,48	$4,5 \times 10^8$
4	2	6,36	$4,5 \times 10^8$
5	2,5	6,18	8×10^6
6	3	6,13	2×10^6
7	3,5	5,96	$3,9 \times 10^5$
8	4	5,79	$1,8 \times 10^5$
9	4,5	5,61	6×10^4
10	5	5,43	$7,5 \times 10^3$

Nous voyons que, jusqu'à *p*H 6,3 à 6,4, l'adsorption est pratiquement nulle, et tous les phages restent dans le liquide surnageant. L'adsorption de 99 % des phages a lieu entre *p*H 6,3 et 6, et continue pour devenir presque totale aux environs de *p*H 5,4; on a vérifié, d'ailleurs, qu'à ce *p*H il n'y a pas, en plus de l'adsorption, de destruction des phages.

Principe et technique de la purification et de la concentration

Après centrifugation et filtration sur bougie, le lysat clair et stérile est traité par $CaCl_2$ à 4 p. 100 en quantité strictement nécessaire pour ne pas dépasser *p*H 6,4 et conserver ainsi la totalité des phages dans le liquide surnageant. Ce premier traitement permet de se débarrasser de la majeure partie des protéines d'origine microbienne contenues dans le lysat, comme R. Wahl et ses collaborateurs [25] l'ont montré. Nous verrons dans un prochain chapitre que l'endotoxine de Boivin [2, 3 et 4] n'est pas éliminée par le traitement par $CaCl_2$. Ceci peut s'expliquer quand on sait

que cette endotoxine est de constitution surtout glucido-lipidique. Il est probable que le phosphate de calcium adsorbe sélectivement les protéines. Au-dessous de *p*H 6,4, on adsorbe le phage qui, lui, est de constitution surtout nucléo-protéidique, et cette adsorption est d'autant plus importante que le *p*H est plus bas.

En utilisant une technique mise au point sur ce principe, nous voyons que nous pouvons, avec peu de manipulations, pousser la purification du phage assez loin. Dans un premier temps, nous éliminons la plus grande partie des protéines et, dans un second temps, nous adsorbons la majeure partie des phages. Il ne nous reste plus, ensuite, qu'à éluer les phages du précipité qui les contient pour avoir un phage assez bien purifié; en utilisant un volume d'éluant inférieur au volume initial de lysat, on peut même avoir une concentration appréciable.

Nous avons seulement pu faire quelques essais basés sur ce principe, dont nous allons donner les résultats. Les expériences ont été faites sur un lysat de D 4/II titrant $1{,}2 \times 10^9$ phages par cm^3. Ce lysat a un *p*H initial de 7 après centrifugation et filtration sur bougie L 3; on pratique une première précipitation jusqu'à *p*H 6,4; après centrifugation, le titre est toujours de $1{,}2 \times 10^9$ par cm^3. Une deuxième précipitation est alors effectuée avec une solution de $CaCl_2$ à 4 p. 100 jusqu'à *p*H 5,9; après centrifugation, le titre, dans le surnageant, est de $1{,}5 \times 10^7$, ce liquide est décanté et, sur le culot de centrifugation, nous avons fait plusieurs essais d'élution par remise en suspension du précipité. Nous avons essayé plusieurs éluants, soit sous le même volume que celui du lysat, soit en essayant de concentrer. Nous allons donner nos résultats :

1° En reprenant par un volume d'éluant égal au volume initial de lysat.

Solution ClNa à 1 p. 100, titre ..... 4×10^7 par cm^3
— ClK à 1 p. 100, titre ..... $4{,}2 \times 10^7$ —

Solution SO_4Mg à 1 p. 100, titre .... $3{,}5 \times 10^7$ par cm³
— CO_3Na_2 à 1 p. 100, titre .... $1{,}5 \times 10^8$ —
— de phosphates tamponnée à *p*H 7,6, à 20 p. 100, titre .. $7{,}5 \times 10^8$ —

2° En reprenant par un volume d'éluant dix fois moindre que le volume initial de lysat.

Solution de CO_3Na_2 à 1 p. 100, titre. $1{,}5 \times 10^9$ par cm³
— de CO_3Na_2 à 3 p. 100, titre. $2{,}4 \times 10^9$ —
— tampon de phosphates à 2 p. 100 (1), titre ..... $1{,}8 \times 10^9$ —
— tampon de phosphates à 20 p. 100, titre ..... 6×10^9 —

Nous constatons que l'élution se fait en fonction du *p*H et paraît d'autant meilleure que la solution saline est plus concentrée. Les solutions diluées, tamponnées à un *p*H alcalin ne sont peut-être pas assez riches pour neutraliser le précipité qui est acide. Il aurait fallu, pour le savoir, étudier le *p*H des phages élués. Nous pensons, cependant, que la méthode donne des résultats suffisamment intéressants pour être approfondie. On a constaté que l'adsorption est assez sélective pour laisser dans le liquide surnageant, outre les sels, la toxine de Boivin. Aussi, l'éluat en est-il débarrassé.

Si les phages ne peuvent être élués que par une solution concentrée en sels, il faudrait envisager de compléter la purification par une dialyse.

(1) Dans un travail récent, on a constaté qu'on pouvait descendre jusqu'à *p*H 5,4 pour l'adsorption, et la concentration à 5 p. 100 a été reconnue comme la plus satisfaisante pour l'élution [34].

DEUXIÈME PARTIE

EXPÉRIMENTATION SUR LA SOURIS

CHAPITRE PREMIER

Technique expérimentale. Elimination et multiplication du phage « in vivo »

Technique

Pour tous nos essais *in vivo* nous avons utilisé des souris blanches en bonne santé, d'un poids moyen de 18 g. Les inoculations de germes et de phages ont été faites par voie intrapéritonéale. Les souris mortes ont été autopsiées avec le maximum d'asepsie, et nous avons prélevé le sang du cœur pour les recherches de germes et de phages.

Nous avons été amené à faire des titrages de germes et de phages dans le sang de souris en expérience sans avoir à les sacrifier. Notre technique était la suivante : le tour de l'œil de la souris étant désinfecté à l'alcool, nous effectuons un prélèvement de 1/10e de cm^3 de sang derrière le globe oculaire, à l'aide d'une petite pipette coudée et stérile. Ce sang est aussitôt hémolysé, soit dans 1 cm^3 d'eau bidistillée stérile si l'on veut une dilution au 1/10e, soit dans 10 cm^3 d'eau bidistillée pour avoir une dilution au 1/100e. Ces dilutions sont faites comparativement à un étalon avec

lequel on fait une vérification colorimétrique approximative. Nous avons pu, de la sorte, faire plusieurs prises de sang à la même souris, à raison d'une par jour, sans qu'elle paraisse en souffrir.

Elimination du phage chez les souris non infectées

Nous avons toujours constaté une élimination assez rapide du phage du sang de la souris lorsque celui-ci est injecté seul. Le titre du phage diminue progressivement dans le sang de la souris pendant les vingt-quatre premières heures, et on ne le retrouve plus après quarante-huit heures. Pour retrouver le phage dans le sang, il faut en injecter une quantité appréciable, de l'ordre de 6×10^6 pour le phage D 4; au-dessous de cette quantité, on ne retrouve rien. Egalement avec le phage D 4, si la quantité de phage injectée est de 3×10^8, le taux, dans le sang, est de :

$1{,}8 \times 10^6$ par cm^3 après une heure.
$1{,}2 \times 10^5$ par cm^3 après sept heures.
9×10^2 par cm^3 après vingt-quatre heures.

Si la quantité de phage injectée est de $1{,}2 \times 10^9$, le taux, dans le sang, est de :

$2{,}4 \times 10^7$ par cm^3 après une heure.
6×10^6 par cm^3 après sept heures.
6×10^3 par cm^3 après vingt-quatre heures.

Pour le phage T 5, l'élimination suit la même courbe et le taux dans le sang est fonction de la concentration du phage injecté. Avec ce phage, nous avons pu maintenir un taux constant dans le sang des animaux en expérience, en pratiquant des injections journalières de phage.

Elimination et multiplication du phage « in vivo »

Certains auteurs ont nié la multiplication du phage *in vivo*, d'autres, comme Dubos [6] et Morton [14] l'ont mise en évidence. Pour notre part, nous l'avons observée souvent mais seulement dans certaines conditions (voir 35). Nous allons citer les résultats de nos expériences et essayer d'en

tirer quelque interprétation. Les conditions expérimentales dans lesquelles nous avons opéré sont les suivantes :

Des lots de deux souris sont injectés avec une même quantité de phage; l'une des deux (souris A) sert de témoin et l'autre (souris B) reçoit une certaine quantité de germes. Nous effectuons ensuite des titrages comparatifs de phages dans le sang des animaux, à intervalles réguliers. Nous suivons ainsi les courbes de concentration de phages et nous estimons qu'il y a eu multiplication quand on trouve dans le sang de la souris qui a reçu les germes une concentration de phages plus élevée que chez le témoin, et que l'élimination du phage est moins rapide. Nous avons déjà vu dans le paragraphe précédent les conditions de l'élimination du phage seul.

A. — Nos premières expériences ont porté sur le phage D 4/0. Nous avons effectué deux essais successifs sur quatre souris divisées en deux lots. Le phage D 4/0 titre 6×10^8 par cm³, il est employé dilué en eau bidistillée, à raison de 1 cm³.

I. — Nombre de germes injectés : 200 millions de la souche 0.

Nombre de phages injectés : 6×10^4.

	Nombre de phages par cm³ de sang	
	A	B
Temps	Témoin	Phage + Germes
6 h.	0	0

II. Nombre de germes injectés : 200 millions de la souche 0.

Nombre de phages injectés : 6×10^6.

	Nombre de phages par cm³ de sang	
	A	B
Temps	Témoin	Phage + Germes
a) 18 h.	0	3×10^5
24 h.	0	$4{,}5 \times 10^5$
b) 6 h.	6×10^2	$1{,}2 \times 10^3$
24 h.	0	3×10^5

B. — Essais pratiqués avec le phage D 4/2 dont le titre est de 3×10^8 par cm³.

I. — Nombre de germes injectés : 200 millions de la souche I.

Nombre de phages injectés : 3×10^6.

	Nombre de phages par cm³ de sang	
	A	B
Temps	Témoin	Phage + Germes
6 h.	0	0
24 h.	0	0

II. — Nombre de germes injectés : 400 millions de la souche I.

Nombre de phages injectés : 3×10^6.

	Nombre de phages par cm³ de sang	
	A	B
Temps	Témoin	Phage + Germes
6 h.	0	$1{,}5 \times 10^5$
24 h.	0	$4{,}5 \times 10^3$

III. — Nombre de germes injectés : 200 millions de la souche II.

Nombre de phages injectés : 3×10^6.

	Nombre de phages par cm³ de sang	
	A	B
Temps	Témoin	Phage + Germes
6 h.	0	$4{,}5 \times 10^3$
24 h.	0	$4{,}5 \times 10^5$

Cette série d'essais sur des souches différentes prouve bien la multiplication du phage *in vivo*.

C. — Nous avons effectué une autre série d'essais en utilisant cette fois du phage non dilué. Ce phage est le D 4/0 titrant 3×10^8 par cm³.

I. — Nombre de germes injectés : 100 millions de la souche 0.

Nombre de phages injectés : 3×10^8.

Temps	Nombre de phages par cm³ de sang A Témoin	B Phage + Germes
1 h.	18×10^6	9×10^4
7 h.	$1{,}2 \times 10^5$	$1{,}5 \times 10^3$
24 h.	9×10^2	0

II. — Nombre de germes injectés : 1 million de la souche 0.

Nombre de phages injectés : $1{,}2 \times 10^9$.

Temps	Nombre de phages par cm³ de sang A Témoin	B Phage + Germes
1 h.	$2{,}4 \times 10^7$	3×10^6
7 h.	6×10^6	$1{,}8 \times 10^5$
24 h.	3×10^3	3×10^2

Nous voyons que, dans ces conditions, en opérant avec du phage non dilué, nous ne constatons pas de multiplication du phage *in vivo*, le taux de celui-ci diminue au contraire plus vite que chez le témoin dans les deux essais envisagés.

D. — Dans une dernière série d'expériences, nous avons étudié la multiplication en utilisant du phage non dilué en quantité constante avec des quantités variables de germes. Nous avons fait ces essais avec le phage D 4/2 titrant $1{,}2 \times 10^9$, et le phage T 5/0 titrant $3{,}5 \times 10^8$.

1° Phage D 4/2. — Nombre de phages injectés : $1{,}2 \times 10^9$.
Nombre de germes injectés : 1.000 de la souche II.

Temps	Nombre de phages par cm³ de sang A Témoin	B Phage + Germes
3 h.	6×10^4	9×10^6
7 h.	6×10^3	$1{,}2 \times 10^5$
24 h.	0	2×10^3

Nombre de germes injectés : 20.000 de la souche II.

Temps	Nombre de phages par cm^3 de sang A Témoin	B Phage + Germes
3 h.	6×10^4	3×10^5
7 h.	6×10^3	2×10^4

Nombre de germes injectés : 200.000 de la souche II.

Temps	Nombre de phages par cm^3 de sang A Témoin	B Phage + Germes
3 h.	6×10^4	9×10^3
7 h.	6×10^3	0

Nombre de germes injectés : 2 millions de la souche II.

Temps	Nombre de phages par cm^3 de sang A Témoin	B Phage + Germes
3 h.	6×10^4	2×10^3
7 h.	6×10^3	0

Nombre de germes injectés : 100 millions de la souche II.

Temps	Nombre de phages par cm^3 de sang A Témoin	B Phage + Germes
3 h.	6×10^4	6×10^6
7 h.	6×10^3	$1{,}2 \times 10^7$

2° Phage T 5/0. — Nombre de phages injectés : 3.5×10^8.

Nombre de germes injectés : 1.000 de la souche II.

Temps	Nombre de phages par cm^3 de sang A Témoin	B Phage + Germes
3 h.	8×10^5	3×10^5
7 h.	3×10^4	$2{,}4 \times 10^3$

Nombre de germes injectés : 20.000 de la souche II.

Temps	Nombre de phages par cm³ de sang A Témoin	B Phage + Germes
3 h.	8×10^5	$2{,}4 \times 10^6$
7 h.	3×10^4	$1{,}2 \times 10^5$

Nombre de germes injectés : 200.000 de la souche II.

Temps	Nombre de phages par cm³ de sang A Témoin	B Phage + Germes
3 h.	8×10^5	4×10^5
7 h.	3×10^4	2×10^3

Nombre de germes injectés : 2 millions de la souche II.

Temps	Nombre de phages par cm³ de sang A Témoin	B Phage + Germes
3 h.	8×10^5	6×10^5
7 h.	3×10^4	3×10^4

Nous voyons qu'avec les deux phages D 4/2 et T 5/0, et pour la même dose élevée de phage, la multiplication n'est décelable qu'avec certaines quantités de germes qui ne sont d'ailleurs pas les mêmes pour les deux phages envisagés. Pour le phage D 4, elle est constatée avec 1.000, 20.000 et 100 millions de germes; pour le phage T 5, elle n'est mise en évidence qu'avec 20.000 germes.

Phage D 4/2 :

Nombre de germes	Multiplication
1.000	+ + +
20.000	+
200.000	—
2.000.000	—
100.000.000	+ +

Phage T 5/0 :

Nombre de germes	Multiplication
1.000	—
20.000	+
200.000	
2.000.000	

Nous pouvons donc conclure de cet ensemble d'expériences que la multiplication du phage est évidente dans certaines conditions qui sont liées à la nature de la souche et du phage et aux proportions respectives de chacun d'eux. Quand la multiplication existe, elle peut, dans une certaine mesure, être rapprochée de celle que l'on observe *in vitro,* elle est fonction du nombre de germes et de phages mis en expérience, ce nombre variant selon la nature de la souche. Prenons par exemple le paragraphe B de notre exposé, nous voyons que la multiplication a lieu avec 200 millions de germes de la souche II, et n'a pas lieu avec la même quantité de germes de la souche I; il faut, *in vitro,* une quantité de germes au moins deux fois plus importante avec la souche I qu'avec la souche II, pour avoir une bonne multiplication. Nous pouvons voir aussi que la multiplication du phage est maxima avec certaines proportions bien définies de phages et de germes, ces proportions étant variables selon les souches et selon les phages, ceci étant tout à fait semblable à ce qui se produit *in vitro.*

Il nous reste enfin à envisager les cas où nous n'observons pas de multiplication. Deux alternatives peuvent se présenter : ou bien le titre se maintient égal à celui du témoin, comme dans le dernier essai avec T 5/0, ou bien, beaucoup plus souvent, on observe une diminution plus ou moins grande et rapide par rapport au témoin du taux des phages dans le sang de la souris qui a reçu les germes. On peut supposer que, dans le premier cas, le phage ne se fixe pas sur les germes, et que, dans le second, il y aurait fixation sans multiplication, peut-être suivie de phagocytose du germe qui a fixé des phages.

CHAPITRE II

Toxicité de certains lysats

Nos essais de purification et de concentration du phage en vue d'un essai thérapeutique nous ont amené à constater et à étudier la toxicité de certains lysats bactériophagiques. Les lysats contiennent en effet, outre les phages, la plupart des constituants du germe qui a servi à leur préparation. Parmi ces constituants, l'antigène O glucido-lipido-polypeptidique, que Boivin a extrait de *Salmonella enteritidis*, est une toxine très active pour la souris. Or, dans un lysat, le nombre de germes détruits étant considérable, il n'est pas étonnant que le taux de cette toxine soit assez élevé. En injectant à des souris du lysat concentré par l'alcool (selon la technique de R. Wahl et P. Blum-Emerique), nous avons constaté les phénomènes toxiques entraînant la mort rapide.

Les conditions de préparation sont les suivantes : 100 cm^3 de lysat sont centrifugés pendant dix minutes pour éliminer les germes non lysés et les débris les plus grossiers. Après alcalinisation par $C_4O_3Na_2$ cristallisé jusqu'à *p*H 7,8, on forme un précipité de phosphates de calcium par addition de 10 cm^3 d'une solution stérile de $CaCl_2$ à 4 p. 100. On centrifuge cinq minutes après quinze minutes de repos à la glacière. Le titre initial étant de 3×10^7, après cette opération le titre est toujours de 3×10^7, et le *p*H est à 6,9. Le liquide surnageant est mis à dialyser pendant dix-huit heures contre eau courante puis divisé en deux parts. L'une est précipitée par l'alcool à 95° à parties égales et centri-

fugée à — 15° ; l'autre a subi la même opération avec une proportion de 100 cm³ d'alcool pour 50. Les deux précipités sont lavés à l'éther à — 15° et repris par une solution tamponnée à *p*H 6,8; la dissolution des précipités n'étant pas complète, on centrifuge à nouveau pendant cinq minutes. Ces lysats sont concentrés dix fois, car les précipités sont repris par 1/10ᵉ du volume initial. En fin d'opération, le titre n'est que de $1{,}5 \times 10^7$. On fait alors trois lots de souris :

1ᵉʳ lot, A : reçoit 200 millions de germes + 1 cm³ de lysat concentré.
B : reçoit 200 millions de germes + 1/2 cm³ de lysat concentré.

2ᵉ lot, A : reçoit 1 cm³ de lysat concentré par l'alcool, à parties égales.
B : reçoit 1/2 cm³ de lysat concentré par l'alcool, à parties égales.

3ᵉ lot, A : reçoit 1 cm³ de lysat concentré par l'alcool, à 100 p. 50.
B : reçoit 1/2 cm³ de lysat concentré par l'alcool, à 100 p. 50.

Toutes ces souris meurent en quinze minutes en présentant des signes d'agitation intense, des convulsions, des contractures, des paralysies. Deux souris, injectées avec 1 cm³ du même phage, après dialyse, mais sans concentration, survivent.

Nous avons effectué une deuxième expérience avec un autre lysat purifié et concentré dans des conditions semblables en vue d'en étudier la dose mortelle. Nous avons pratiqué des dilutions de ce lysat en eau physiologique au 1/10ᵉ, au 2/10ᵉ, au 3/10ᵉ, au 4/10ᵉ et au 5/10ᵉ, et nous avons inoculé cinq lots de deux souris avec 1 cm³ de chaque dilution intrapéritonéale. Les souris des trois lots qui ont reçu les dilutions au 3/10ᵉ, 4/10ᵉ et 5/10ᵉ meurent en quinze minutes avec les mêmes phénomènes toxiques que précédemment,

Les deux souris qui ont reçu la dilution au 2/10e meurent après deux heures. Les souris du dernier lot, qui ont reçu la dilution au 1/10e, survivent.

Il faut conclure de ces expériences que la précipitation par l'alcool concentre la toxine contenue dans les lysats. L'emploi d'un bactériophage préparé dans ces conditions est donc très dangereux. De plus, on peut démontrer que c'est le phage qui, par la lyse, libère cette toxine. Pour en faire la preuve, nous avons pratiqué un essai de concentration par l'alcool dans les conditions identiques sur une culture du même germe après huit heures d'étuve. Le précipité, repris par la même solution tampon de *p*H 6,8, a été injecté à quatre souris. Deux reçoivent 1/2 cm³, et deux 1 cm³, et nous n'avons rien constaté d'anormal.

Etude, au point de vue toxique, de lysats préparés avec d'autres souches de S. Danysz et d'autres espèces de Salmonelles.

Toutes les expériences de toxicité que nous venons d'étudier ont été faites avec des lysats du phage D 4 sur notre souche X de Bacille de Danysz. Nous avons pensé qu'en préparant des lysats avec des souches dépourvues de toxine, nous pourrions nous dispenser des purifications. C'est à ce titre que nous avons essayé de faire lyser par notre phage D 4 différentes souches Rough de Salmonelles. Tous nos essais dans ce sens sont restés infructueux. Ce phage ne pouvant pas se multiplier sur ces souches, nous avons alors préparé des lysats sur variété Smooth de Bacille typhique, le pouvoir pathogène de ce dernier étant très faible pour la souris. Le phage préparé avec du bacille typhique est actif sur le Bacille de Danysz, au même titre. Nous avons fait subir à des lysats ainsi préparés la concentration par l'alcool, et nous avons injecté plusieurs souris avec ce phage concentré sans aucun préjudice pour celles-ci. Ayant voulu reprendre nos expériences sur la toxicité des lysats prépa-

rés avec une nouvelle souche de S. Danysz (notre souche 0), nous n'avons jamais pu les reproduire. Des souris ayant reçu jusqu'à 2 cm^3 d'un lysat préparé avec cette souche et concentré vingt fois ont survécu. Cette souche 0 étant pathogène et donnant des lysats non toxiques, c'est sur elle que nous avons poursuivi nos expériences. Nous devons penser de ce qui précède que la richesse des souches du Bacille de Danysz en endotoxine est très variable.

CHAPITRE III

Doses mortelles — Symptomatologie Essais thérapeutiques

Doses mortelles

Appelons, pour la commodité, dose mortelle, la dose la plus faible qui, injectée par voie intrapéritonéale à un lot de souris, provoque la mort de *tous les animaux* en six à huit jours au maximum. Ces doses sont variables selon les souches, comme nous allons le voir :

Souche 0. — La dose mortelle était initialement de 200 germes, puis la souche ayant subi des mutations, son pouvoir pathogène a diminué.

Souche I. — Son pouvoir pathogène est faible et il faut au moins 5.000 germes pour provoquer la mort en six à huit jours.

Souche II. — La dose mortelle est de 500 germes. Cette souche ayant subi un passage sur souris, nous avons la souche S II dont la dose mortelle est de 200 germes.

Nous avons, de plus, étudié le pouvoir pathogène de quantités plus élevées de germes. Voici les résultats que nous avons obtenus :

Souche X. — Six souris divisées en trois lots :

1er lot : reçoit 100 millions de germes.
2e lot : — 200 — —
3e lot : — 300 — — —

Le 3e lot meurt en une heure; le 2e lot meurt en soixante heures; le 1er lot meurt en trois jours.

Souche 0. — *a)* Six souris divisées en trois lots :

1er lot : reçoit 100 millions de germes.
2e lot : — 200 — —
3e lot : — 300 — —

Les 2e et 3e lots meurent en moins de soixante heures; le 1er lot meurt en quatre jours.

b) Six souris divisées en trois lots :

1er lot : reçoit 100.000 germes.
2e lot : — 5.000 —
3e lot : — 500 —

Le 1er lot meurt en quatre jours; le 2e lot meurt en cinq jours; le 3e lot meurt en six jours.

Symptomatologie de l'infection

Lorsque l'on injecte une petite quantité de germes à la souris, 1.000 germes par exemple, on ne peut mettre en évidence la présence de germes dans le sang qu'aux environs du troisième jour. Dès la première prise de sang, trois heures après l'injection, les germes ont disparu de la circulation. On doit donc supposer que ces germes sont localisés en certains points de l'organisme dans lesquels ils se multiplient, et d'où ils essaiment. A partir du troisième jour, les germes apparaissent dans le sang et leur taux, dans ce dernier, augmente en général (1) constamment jusqu'à la mort qui survient entre le cinquième et le huitième jour. A la fin de l'évolution, apparaît une diarrhée sanguinolente, ce qui laisse supposer que la septicémie est accompagnée de lésions intestinales. Ces faits ont été constatés avec différentes doses de germes allant jusqu'à deux millions. Dans ce dernier cas, cependant, les bacilles apparaissent plus tôt dans le sang. Avec des doses plus élevées, 100 millions de germes par exemple, ceux-ci se trouvent dans le sang dès les premières heures qui suivent l'injection, et leur taux augmente vite, entraînant une mort rapide.

(1) Nous verrons plus loin que les germes disparaissent parfois momentanément du sang.

Essais thérapeutiques

Nous nous proposons, dans ce paragraphe, de citer nos expériences faites dans le but de stériliser l'organisme de la souris et d'obtenir la guérison. Nous avons essayé de traiter différents lots de souris avec différents phages et dans différentes conditions. Nous allons mentionner tous ces essais et donner nos résultats.

a) *Essais pratiqués avec la souche 0 et le phage D 4*

Les souris sont infectées par une injection de 1 cm^3 de suspension microbienne contenant 200 germes qui constitue la dose mortelle, puis divisées en deux lots dont l'un reçoit le phage. Le phage utilisé pour le traitement est le D 4/0 titrant $1{,}2 \times 10^8$ par cm^3. Ce phage a été précipité, après addition de CO_3Na_2, par $CaCl_2$ puis dialysé et filtré.

1° Les souris reçoivent 1 cm^3 de phage aussitôt après l'injection des germes. On n'observe, dans ce cas, aucune survie, et les souris traitées meurent en même temps que les souris témoins.

2° Les souris reçoivent 1 cm^3 de phage tous les jours. On constate le même résultat.

3° Les injections de phage sont faites à raison de 1/4 de cm^3 toutes les trois heures, le résultat est encore négatif. Nous avons même souvent observé une mort plus rapide des souris traitées que des témoins, dans ces derniers cas.

4° En utilisant du phage dilué à 10^{-2} et 10^{-4}, soit en une seule injection, soit en injections répétées, les résultats ont été semblables.

b) *Essais pratiqués avec la souche 0 et le phage D 4 en association avec d'autres phages*

Nous avons essayé d'associer au phage D 4 différents autres phages et en particulier D 5, D 8 et T 5. Ces différents essais n'ont été que des échecs.

c) *Essais pratiqués avec la souche II*

Tous nos essais ont été négatifs, sauf dans un seul cas où nous avons eu une survie. La dose infectante était de 500 germes, et le phage utilisé était D 4 multiplié sur la souche I qui, à ce moment là, était contaminée par le phage D 5 A. Ce phage avait la particularité de ne pas donner, sur gélose, de colonies résistantes après la lyse. Nous avons pu, par ailleurs, retarder la mort chez quelques souris contaminées par la souche II et traitées par des injections quotidiennes de phage T 5/0 ou T 5/2.

Nous voyons donc que, quelle que soit la méthode utilisée, nos essais thérapeutiques par le phage ont été des échecs. C'est pourquoi nous avons voulu chercher les causes de ces échecs en étudiant, après l'élimination et la multiplication du phage *in vivo,* l'évolution des germes en présence de phages *in vivo* et *in vitro.*

CHAPITRE IV

Evolution des germes chez la souris ayant reçu des injections de phages

Cette étude a été effectuée sur les germes contenus dans le sang des souris en expérience (R. Wahl et A. Terrade [35]). Le sang a été prélevé selon la technique que nous avons indiquée, et après dilution au 1/10e ou au 1/100e dans l'eau bidistillée stérile, nous avons fait des numérations de colonies par étalement sur boîtes de Pétri de 1/10e de cm^3 de ces dilutions. La différenciation des germes sensibles et résistants a été faite de la façon suivante : la dilution a été étalée, d'une part, avec du phage concentré et spécifique, de manière à ne laisser pousser que les germes résistants, d'autre part, avec du sérum antiphage spécifique pour obtenir, dans ce cas, la somme des germes sensibles et résistants; la différence nous donnant le nombre des sensibles. Nous avons utilisé cette même méthode, comme nous le verrons plus loin, pour l'étude du comportement des germes *in vitro*.

Nous allons diviser cette étude en plusieurs parties, selon les conditions dans lesquelles nous avons opéré, et en étudiant d'abord l'évolution des germes chez la souris infectée.

A. — Lorsqu'une souris reçoit, par voie intrapéritonéale, une quantité de germes allant de 200 à 2 millions, on ne retrouve aucun germe dans le sang pendant les premières quarante-huit heures. Le troisième jour, on met en évidence

quelques germes. Puis deux cas peuvent se présenter : ou bien les germes disparaissent quelque temps pour réapparaître ensuite, ou bien leur nombre ne cesse d'augmenter dans le sang jusqu'à la mort de l'animal. A ce moment, le taux peut aller jusqu'à 200.000 germes par cm^3 de sang. Si le nombre de germes injectés est de l'ordre de 100 millions, on met ceux-ci en évidence dans le sang dès le début, et leur taux augmente en produisant une mort rapide.

B. — Nous allons maintenant montrer, à l'aide d'exemples, comment les germes évoluent dans l'organisme de la souris quand celle-ci reçoit du phage. Nous avons fait des essais avec des quantités variables de germes et avec des phages différents. Tous ces essais ont été effectués avec la souche II. Les résultats sont donnés par cm^3 de sang.

Nous avons utilisé deux souris dans chaque cas : l'une reçoit un certain nombre de germes et sert de témoin (souris A), l'autre recevant le phage et le même nombre de germes (souris B).

1° *Phage D 4/2 titrant* $1{,}2 \times 10^8$ *par* cm^3.

a) Essai pratiqué avec 1.000 germes et 1 cm^3 de phage.

Résultats :

Après 3 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	100 germes par cm^3
	résistants	100 — —
Après 7 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	0
Après 24 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	80.000 germes par cm^3
Après 72 heures ..	souris A	100.000 — —
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	100.000 germes par cm^3

b) Essai pratiqué avec 20.000 germes et 1 cm³ de phage.

Résultats :

Après 5 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	0
Après 24 heures ..	souris A	200 germes par cm³ (1)
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	200 germes par cm³
Après 48 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	0

c) Essai pratiqué avec 200.000 germes et 1 cm³ de phage.

Résultats :

Après 7 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	0
Après 24 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	300.000 germes par cm³
Après 48 heures ..	souris A	10.000 germes par cm³
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	2.000 germes par cm³
Après 72 heures ..	souris A	25.000 germes par cm³
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	25.000 germes par cm³

d) Essai pratiqué avec 2 millions de germes et 1 cm³ de phage.

Résultats :

Après 5 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	0

(1) Ce cas est une exception à la règle générale.

Après 24 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	1.000 germes par cm³
	résistants	0
Après 72 heures ..	souris A	20.000 germes par cm³
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	1.000.000 de germes par cm³

c) Essai pratiqué avec 100 millions de germes et 1 cm³ de phage.

Résultats :

Après 5 heures ..	souris A	6.000 germes par cm³
Souris B.....	sensibles	6.000 — —
	résistants	0
Après 24 heures ..	souris A	1.000.000 de germes par cm³
Souris B.....	sensibles	22.000 germes par cm³
	résistants	1.000 — —

Après 72 heures, la souris qui a reçu le phage est morte; nous n'avons pas effectué de nouvelle numération des germes.

2° Phage T 5/0 titrant 4,5 × 10⁷ par cm³

Les essais avec ce phage ont été pratiqués dans les mêmes conditions qu'avec le phage D 4/2.

a) Essai pratiqué avec 1.000 germes et 1 cm³ de phage.

Résultats :

Après 24 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	0
Après 48 heures ..	souris A	1.500 germes par cm³
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	15.000 germes par cm³
Après 72 heures ..	souris A	4.500 germes par cm³
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	30.000 germes par cm³

b) Essai pratiqué avec 20.000 germes et 1 cm³ de phage.

Résultats :

Après 24 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	18.000 germes par cm³
Après 48 heures ..	souris A	7.500 germes par cm³
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	9.000 germes par cm³
Après 72 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	21.000 germes par cm³

c) Essai pratiqué avec 200.000 germes et 1 cm³ de phage.

Résultats :

Après 24 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	0
Après 48 heures ..	souris A	1.200 germes par cm³
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	1.200 germes par cm³

d) Essai pratiqué avec 2 millions de germes et 1 cm³ de phage.

Résultats :

Après 24 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	0
Après 48 heures ..	souris A	0
Souris B.....	sensibles	0
	résistants	30.000 germes par cm³

Nous avons, de plus, fait un essai avec trois souris qui reçoivent chacune 2.000 germes de la souche II. L'une sert de témoin (souris A), une autre reçoit une injection de 1 cm³ de phage (souris B), la troisième reçoit 1 cm³ de

phage tous les jours (souris C). Les résultats des titrages de germes dans le sang sont les suivants :

Après 24 heures..	témoin	0
	traitées	0
Après 48 heures..	souris A	0
	— B	1.000 germes par cm³
	— C	5.000 — —
Après 72 heures..	souris A	5.000 germes par cm³
	— B	3.000 — —
	— C	3.500 — —
Après 90 heures..	souris A	0
	— B	0
	— C	30.000 germes par cm³
Après 162 heures..	souris A	70.000 germes par cm³
	— B	200 — —
	— C	0
Après 186 heures..	souris A	mort.
	— B	0
	— C	0
Après 210 heures..	souris B	150 germes par cm³
	— C	0
Après 234 heures..	souris B	72.000 germes par cm³
	— C	0

La souris B meurt à ce moment là; la souris C, traitée tous les jours, survit pendant quatorze jours, puis meurt à son tour.

Nous allons résumer les différents cas envisagés et essayer de les interpréter. Chez la souris contaminée non traitée, les germes n'apparaissent dans le sang qu'après quarante-huit heures et persistent généralement jusqu'à la mort. Parfois, ils disparaissent momentanément, cette disparition étant sans doute due à une réaction de défense de l'organisme contre l'infection. Nous constatons dans ce dernier cas une seconde poussée de germes beaucoup plus importante et qui entraîne la mort de l'animal.

Chez la souris traitée par le phage, nous constatons plusieurs faits nouveaux. Nous trouvons dans certains cas (souris ayant reçu un petit nombre ou un nombre moyen de bactéries) une quantité importante de bactéries dans le sang dans les premières heures. Ce fait est remarquable, car on ne trouve jamais de bactéries à ce moment dans le sang des souris ayant reçu des doses faibles ou moyennes de bactéries sans phages.

L'animal peut réagir alors de deux façons : ou bien, comme nous l'avons constaté plusieurs fois, il succombe à cette première poussée microbienne, ou bien les germes semblent disparaître du sang, pour réapparaître ensuite, mais ils sont persistants cette fois, et la mort survient alors dans les mêmes délais que chez les souris non traitées. Nous avons aussi constaté plusieurs fois qu'à la période terminale immédiatement avant la mort, les germes que l'on trouve chez une souris traitée sont de nouveau des germes sensibles au phage. Ces curieuses apparitions successives de résistants puis de sensibles peuvent expliquer les succès partiels obtenus par les injections quotidiennes de phage, si toutefois la souris ne succombe pas dans les premiers jours. Au total, chez les souris ayant reçu une quantité de germes faible ou moyenne (moins de 2 millions), le sang contient parfois des germes plus tôt, quand l'animal a reçu du phage; d'autres fois, les germes apparaissent dans les mêmes délais, mais souvent en plus grand nombre, presque jamais on observe une quantité moindre de germes chez la souris traitée que chez le témoin. L'action curatine *in vivo* n'apparaît pas dans ce cas, au contraire, on constate parfois une plus forte prolifération des germes que chez le témoin. On ne met en évidence, dans la règle, la diminution du nombre des germes sous l'influence du phage que chez les animaux ayant reçu une grande quantité de germes, de l'ordre de 100 millions par exemple. Nous verrons plus loin que nous avons constaté les faits comparables *in vitro*, où le nombre de bactéries lysées est d'autant plus grand

que l'ensemencement est plus important, et où des bactéries sensibles peuvent persister en présence de phages (1).

Enfin, nous avons vérifié plusieurs fois que les germes résistants avaient le même pouvoir pathogène que les sensibles.

---

(1) Deux fois nous avons vu apparaître, chez des souris qui avaient reçu 200 germes, une grande poussée de ceux-ci dans le sang des animaux sous l'influence du phage dans les quelques heures qui suivaient l'injection. Ces germes étaient sensibles au phage et ont provoqué la mort rapide des souris.

TROISIÈME PARTIE

COMPORTEMENT DES GERMES DANS LES CULTURES EN PRÉSENCE DES PHAGES

Il nous a paru que des notions importantes sur la cause des échecs de nos essais thérapeutiques pourraient être tirées de la solution des deux questions suivantes :

1° Est-il possible de stériliser une culture par le phage, et dans quelles conditions ?

2° Comment les cultures en milieu liquide évoluent-elles en présence de phages, et quels sont les facteurs qui influencent cette évolution ?

Elles ont été traitées en partie dans un mémoire que nous avons publié avec le Docteur Wahl [33], et auquel nous ferons de nombreux emprunts.

CHAPITRE PREMIER

Conditions de la stérilisation d'une culture par les phages

Le présent chapitre est consacré à la première question. Nous envisagerons successivement les cultures en milieu liquide et sur gélose.

I. — Cultures en milieu liquide

Les conditions expérimentales sont les suivantes : des tubes contenant 10 cm^3 d'eau peptonée sont ensemencés avec des quantités connues et variables de bactéries et reçoivent en même temps des quantités variables de phages.

Des tubes témoins reçoivent les mêmes quantités de bactéries que les précédents. D'autres témoins servent à vérifier la stérilité des préparations de phages.

Quand il y a stérilisation, on ne voit se développer aucune culture, même après plusieurs jours, et un ensemencement sur gélose reste stérile. Les pousses bien visibles, même suivies de lyse partielle ou apparemment totale, ne donnent jamais de stérilisation *in vitro*. Quand il n'y a pas stérilisation, l'apparition d'une culture visible se fait tôt ou tard, soit en même temps que dans la culture témoin, soit avec un retard de quelques heures à plusieurs jours, soit avant la culture témoin.

Les phages peuvent donc avoir une action stérilisante, retardatrice ou accélératrice.

L'action du phage dépend de la race et du mode de

préparation de celui-ci, et de sa concentration. De plus, on peut modifier cette action en mélangeant plusieurs races de phages. Nous allons étudier successivement ces trois points.

a) *Influence de la race et du mode de préparation du phage*

Tous les essais ont été faits avec 1 cm^3 de lysat dans 10 cm^3 d'eau peptonée.

Nous allons envisager successivement les essais faits avec les phages D 4 et T 5 préparés sur différentes souches et accessoirement avec d'autres phages. Tous ces essais ont été effectués sur la souche II.

1° Phage D 4/2, titre : $1{,}2 \times 10^9$ par cm^3.

La stérilisation de 200 germes par ce phage n'est pas rare, mais elle est inconstante. Pour les quantités de germes supérieures, elle est exceptionnelle, et le retard dans la pousse par rapport au témoin est souvent pratiquement nul.

2° Phage D 4/1, titre : 3×10^9 par cm^3.

Il n'y a jamais eu de stérilisation, quel que soit le nombre de germes, tout au plus observe-t-on un léger retard.

3° Phages D 5/1 et D 5/2.

Ces deux phages n'ont, eux aussi, aucune action stérilisante.

4° Phage T 5/0, titre : $4{,}5 \times 10^8$ par cm^3.

Ce phage a stérilisé toujours définitivement 2.000 germes. Pour 20.000, 200.000 et 2 millions de germes, nous avons observé tantôt des stérilisations définitives, tantôt pas de stérilisation, avec le plus souvent un retard plus ou moins grand dans la pousse de la culture.

5° Phage T 5/2, titre : $1{,}6 \times 10^8$ par cm^3.

Ce phage a une action analogue au précédent, son effet stérilisant semble cependant moins fréquent.

6° Phage T 5/1, titre : $1{,}2 \times 10^7$ par cm^3.

Ce phage ne donne pas de stérilisation et provoque seulement un léger retard dans la pousse des cultures.

Un certain nombre de faits intéressants ont été observés. L'action varie, toutes choses égales d'ailleurs, suivant le phage utilisé et pour le même phage suivant la souche avec laquelle il a été préparé.

L'action stérilisante est assez rare. Elle a surtout été observée avec le phage T 5, plus rarement avec D 4, jamais avec D 5. Encore faut-il que les phages soient en grand excès et les bactéries peu nombreuses.

En outre, elle n'est pas constante pour des conditions expérimentales identiques. Par exemple, si on ensemence en même temps une vingtaine de tubes avec 20.000 bactéries et 1 cm^3 de la même préparation de T 5, on constate une stérilisation dans une partie des tubes seulement.

L'action retardatrice a été très souvent observée, elle est parfois très importante, de l'ordre de quarante-huit heures, ce qui fait croire d'abord, dans certains cas, à une stérilisation totale.

Après quelques jours d'étuve, à la fin de l'expérience, les tubes contenant le phage sont, suivant les cas, plus clairs ou moins clairs que les tubes témoins.

Enfin, les germes qui ont poussé dans les tubes qui ont reçu le phage sont, en fin d'expérience, habituellement résistants à ce phage. Il y a pourtant des exceptions.

Etant donné qu'il y a toujours un excès de phages par rapport aux germes, on aurait pu penser que la stérilisation serait complète s'il ne se trouvait aucun résistant parmi les germes ensemencés.

Or, on observe que la stérilisation est possible, mais inconstante, en utilisant, avec la même quantité du même phage, des quantités de germes de la même culture qui sont entre elles dans le rapport de 1 à 100.

Il n'est donc pas possible que la stérilisation dépende uniquement de l'absence de bactéries résistantes.

Il faut donc penser que l'action du phage sur les bactéries sensibles n'est pas le seul facteur qui intervienne dans le phénomène de la stérilisation.

b) *Influence de la concentration du phage*

La concentration du phage et les proportions phages-germes ont une influence certaine sur la stérilisation et sur le retard de la pousse des cultures. Nous avons choisi pour faire nos essais les deux phages nous donnant des stérilisations assez fréquentes :

le T 5/0, titre : $4{,}5 \times 10^8$ par cm^3
et le T 5/2, titre : $1{,}6 \times 10^8$ par cm^3.

Nous avons utilisé les quantités suivantes de germes de la souche II : 2.000, 20.000, 200.000 et 2 millions. Le phage a été mis en contact dans des tubes de 10 cm^3 d'eau peptonée avec chaque quantité de germes à raison de 1 cm^3 de lysat pur, 1 cm^3 dilué au $1/10^e$ et 1 cm^3 au $1/100^e$. Les tubes sont laissés à l'étuve à 37°. Nous allons mentionner les résultats dans deux tableaux pour T 5/2 et T 5/0, en mentionnant les pousses plus ou moins visibles par les signes suivants : 0, ±, +, + +, + + +.

1° Phage T 5/2

Nombre de germes	Volume de phage	16 h.	23 h.	40 h.	88 h.
2.000	1 cm^3	0	0	0	0
2.000	1 cm^3 au $1/10^e$	0	0	0	0
2.000	1 cm^3 à 10^{-2}	0	+	+ +	+ + +
20.000	1 cm^3	±	0	+ +	+ + +
20.000	1 cm^3 au $1/10^e$	±	+ +	+ +	+ + +
20.000	1 cm^3 à 10^{-2}	±	+ +	+ + +	+ + +
200.000	1 cm^3	±	0	+ +	+ + +
200.000	1 cm^3 au $1/10^e$	+	+ +	+ +	+ + +
200.000	1 cm^3 à 10^{-2}	0	±	0	+ +
2.000.000	1 cm^3	+ +	+ + +	+ + +	+ + +
2.000.000	1 cm^3 au $1/10^e$	+ +	±	+ +	+ + +
2.000.000	1 cm^3 à 10^{-2}	+ +	+ +	+ + +	+ + +

Le phage pur et au 1/10e stérilise 2.000 germes; employé à la dilution 10^{-2}, il retarde la pousse mais ne stérilise pas. Avec 2.000 et 200.000 germes, il y a une légère pousse puis une lyse suivie de repousse. Avec 200.000 germes et le phage à 10^{-2}, la pousse est retardée, suivie d'une lyse puis d'une repousse.

Nous essaierons d'interpréter ces faits dans le chapitre suivant, consacré à l'étude de l'évolution des cultures.

2° Phage T 5/0

Nombre de germes	Volume de phage	19 h.	26 h.	43 h.	67 h.
2.000	1 cm³	0	0	0	0
2.000	1 cm³ au 1/10e	0	0	0	0
2.000	1 cm³ à 10^{-2}	0	++	++	++
20.000	1 cm³	0	0	0	0
20.000	1 cm³ au 1/10e	++	+++	+++	+++
20.000	1 cm³ à 10^{-2}	++	+	+++	+++
200.000	1 cm³	0	0	++	+++
200.000	1 cm³ au 1/10e	+++	+	++	+++
200.000	1 cm³ à 10^{-2}	++	+++	+++	+++
2.000.000	1 cm³	0	++	+++	+++
2.000.000	1 cm³ au 1/10e	+++	+	++	+++
2.000.000	1 cm³ à 10^{-2}	++	+++	+++	+++

Nous voyons, d'après les deux expériences précédentes, que la nécessité d'une grande concentration de phage et d'une faible quantité de bactéries est évidente pour obtenir une stérilisation *in vitro*.

Pour le phage T 5/0, par exemple :

A la dose de 1 cm³, il stérilise 2.000 et 20.000 germes et retarde la pousse avec 200.000 et 2 millions;

A la dose de 1/2 cm³, il stérilise 2.000 germes et retarde la pousse de 20.000, 200.000 et 2 millions;

A la dose de 1/10e de cm³, il stérilise 2.000 germes et retarde la pousse seulement de 20.000 et 200.000 germes;

A la dose de 1/100e de cm³, il ne stérilise rien et retarde seulement la pousse de 2.000 germes.

L'influence de la concentration du phage n'est pas niable, mais il est bien probable que d'autres facteurs interviennent. En effet, nous avons parfois obtenu une stérilisation avec 1/2 cm³ de phage, alors qu'elle manquait avec 1 cm³. On peut supposer que le rapport phages-germes doit être compris entre certaines limites pour que la stérilisation ait lieu. Mais d'autres faits aberrants ont été observés, comme nous l'avons vu : la stérilisation est inconstante dans une série d'expériences faites dans des conditions identiques.

Nous sommes ramené à la même hypothèse qu'au paragraphe précédent :

On peut supposer qu'en plus des phages eux-mêmes, d'autres éléments apportés par le lysat peuvent jouer un rôle dans la destruction des germes.

c) *Action des mélanges de phages*

Nous avons fait des séries d'essais en milieu liquide pour étudier l'action de mélanges de phages différents, pensant avoir une meilleure action stérilisante; nous avons constaté des faits très contradictoires. Les phages employés en mélange ont souvent une meilleure action que s'ils sont employés seuls; il arrive cependant, souvent, que cette action soit plus mauvaise; la présence de certains phages comme D 5 paraît avoir une action défavorable dans la plupart des cas. Nous avons, de plus, remarqué que les proportions de chaque phage utilisé font varier les résultats d'une façon importante; on a l'impression que l'un des phages, prenant le dessus, donne à la culture la même allure que s'il est employé seul. Nous avons même constaté, souvent, une accélération très nette dans la pousse de cultures faites en présence de certains phages, soit employés seuls, soit en mélange. Ainsi, un mélange à parties égales

des phages D 4/I et de D 5/I donne une culture nette et visible au bout de quelques heures avec 200 germes, alors que le témoin sans phage est encore clair. D'autres mélanges ou d'autres phages seuls nous ont donné le même phénomène. Nous avons fait un très grand nombre d'expériences comparatives dans différentes conditions, ce qui nous a permis de constater tous ces faits. Le seul mélange qui nous ait permis d'améliorer la stérilisation est le mélange T 5/0 + D 5 A/I. Les autres mélanges n'ont donné, dans l'ensemble, que des résultats négatifs, souvent même nous avons constaté une action accélératrice sur la pousse des cultures.

Nous tenons à signaler, par ailleurs, un autre fait qui nous a paru intéressant. Ayant fait passer la souche II sur souris et ayant obtenu la souche S II, nous avons constaté que nous pouvions, dans de nombreux cas, stériliser plus facilement cette dernière.

II. — Cultures sur gélose

Ces expériences ont été faites sur gélose à 1,5 p. 100 coulée en boîtes de Pétri, que nous utilisons pour faire nos titrages de phages. Nous avons étalé un certain nombre de germes avec des quantités constantes de différents phages employés seuls ou en mélange. Nous avons obtenu, soit la stérilisation complète de la culture, soit l'apparition d'un nombre plus ou moins important de colonies résistantes. Nous allons mentionner nos expériences montrant l'influence de la race de phage utilisée, et celle des mélanges de phages.

a) *Influence de la race du phage*

Nous avons fait des essais comparatifs avec les différents phages que nous avions à notre disposition pour étudier leur pouvoir stérilisant sur les germes d'une même souche. Tous ces essais ont été faits avec la souche II. Les phages sont les suivants :

D 4/1, titre ..... 3×10^9 par cm^3
D 4/2, — ..... $1{,}2 \times 10^9$ —
T 5/0, — ..... $4{,}5 \times 10^8$ —
T 5/1, — ..... $1{,}2 \times 10^7$ —
T 5/2, — ..... $1{,}6 \times 10^8$ —
D 5/1, — ..... $7{,}5 \times 10^7$ —
D 5/2, — ..... $1{,}2 \times 10^9$ —

Pour chaque phage, on étale sur une boîte la même quantité connue de germes et V gouttes de chaque phage. Les boîtes sont ensuite portées à l'étuve pendant trois jours avant de faire la numération des colonies, car celles-ci sont souvent longues à apparaître. Nous allons mentionner nos résultats dans un tableau d'ensemble :

Phages	Nombre de bactéries ensemencées :		
	2×10^3	2×10^4	2×10^5
	Nombre de colonies :		
D 4/1	0	quelques-unes	quelques-unes
D 4/2	20	nombreuses	nombreuses
D 5/2	0	3	50
D 5/A 1	0	60	800
T 5/0	0	0	0
T 5/1	0	quelques-unes	quelques-unes
T 5/2	0	0	0

Nous voyons que, sur milieu solide, les résultats sont analogues à ceux que nous avons mentionnés dans nos expériences en milieu liquide. Les phages T 5/0 et T 5/2 sont ceux qui donnent la meilleure stérilisation. Mais ici chaque colonie est issue d'une bactérie présente dès le début dans la population, alors qu'en milieu liquide des mutations se produisent au cours de la multiplication. On peut donc admettre, en première approximation, que la proportion des résistants au phage considéré, présents dans

la souche, peut être calculée d'après le nombre de colonies. Dans les cas où il en existe, on comprend qu'il n'y ait pas de stérilisation en milieu liquide, car les germes sensibles étant lysés, une seule bactérie résistante suffit pour donner une culture.

Au contraire, quand l'étalement sur gélose montre qu'il n'y a pas de résistants à T 5/0, par exemple, dans une population de 2 millions de germes, on ne comprend pas pourquoi, en milieu liquide, T 5/0 ne stérilise souvent même pas 20.000 germes. Nous pourrions incriminer l'influence de la dilution du phage, plus grande dans le milieu liquide, mais nous verrons dans le chapitre suivant que là n'est pas la seule raison de la non concordance des résultats.

b) *Expériences faites avec des mélanges de phages*

Nous avons observé une action lytique beaucoup plus poussée en utilisant sur gélose des phages en mélange. Les phages D 4/1 et D 4/2, employés en mélange, donnent moins de colonies résistantes sur la souche II que s'ils sont employés séparément. Nous allons citer deux expériences à titre d'exemple :

Phages D 4/1, titre	6×10^8	par	cm^3
— D 4/2, —	$1{,}5 \times 10^9$	—	
— T 5/0, —	3×10^4	—	

Nous avons étalé, sur quatre boîtes de gélose, 10 millions de germes de la souche II puis un des trois phages, à raison de VI gouttes sur chacune des trois premières, et le mélange des trois phages, à parties égales, sur la quatrième.

Le phage D 4/1 donne un grand nombre de résistants qui forment une couche continue de germes sur le fond de la boîte; cette couche est parsemée de nombreuses plages secondaires. On observe la même chose avec le phage T 5/0. Le phage D 4/2 donne un assez grand nombre de colonies résistantes de deux sortes : quelques-unes assez grandes, et un grand nombre de petites colonies floues. Quant à la

boîte qui a reçu le mélange des trois phages, elle reste stérile après quarante-huit heures.

Nous avons fait une deuxième expérience avec les phages suivants :

T 5/0, titre ..... $4{,}5 \times 10^8$ par cm^3
D 5/2, — ..... $1{,}2 \times 10^9$ —
D 5 A/1, titre ..... $7{,}5 \times 10^7$ —

Ces phages sont étalés en mélange, à parties égales, à raison de VI gouttes avec des quantités croissantes de germes, sur des boîtes de Pétri. Après quarante-huit heures d'étuve, on constate la stérilisation jusqu'à 200.000 germes; avec 2 millions de germes, on ne compte que sept colonies résistantes.

Nous voyons, là aussi, que les résultats sont meilleurs qu'en milieu liquide et que l'action améliorante de mélanges de phages sur la stérilisation est bien plus marquée.

Au total, tous les faits, en apparence contradictoires, étudiés dans ce chapitre nous ont ramené à cette idée que, si pour stériliser les cultures, les phages doivent être concentrés et les populations bactériennes ne doivent pas contenir de résistants, il est probable que d'autres facteurs interviennent.

C'est pourquoi nous avons décidé d'entreprendre une étude plus approfondie de ces phénomènes en suivant l'évolution des cultures en présence de phages *in vitro* en milieu liquide. Les résultats en sont donnés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II

Evolution des cultures en milieu liquide en présence de phages

Nous avons effectué cette étude successivement avec les phages D 4/2 et T 5/0 qui sont, comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, très différents par la plupart de leurs caractères. Les phages sont utilisés comme dans le reste de notre travail, après précipitation de phosphate de calcium et filtration en milieu alcalin (1). La technique expérimentale est la suivante : deux tubes de 10 cm^3 d'eau peptonée sont ensemencés avec la même quantité de germes, l'un reçoit, en plus, une certaine quantité de lysat. Les tubes sont placés à l'étuve à 37°, et l'on fait, à intervalles réguliers, des numérations de germes. Pour le témoin, on étale un volume déterminé ($1/10^e$ de cm^3) du contenu du tube correspondant ou d'une dilution appropriée de ce contenu.

Le nombre de germes est calculé d'après le nombre de colonies.

Pour le tube ayant reçu du phage, on utilise la même technique, mais l'on fait deux étalements chaque fois; dans l'un, on étale en même temps II gouttes de lysat non dilué; dans l'autre, II gouttes de sérum antiphage spécifique. Le nombre des colonies du premier indique le nombre de germes résistants présents dans le milieu; la différence entre les deux étalements indique en principe le nombre de

(1) Voir page 20.

germes sensibles présents au même moment. (Nous verrons plus loin qu'un correctif peut être apporté à cette notion de germes sensibles.)

Toutes les expériences ont été faites avec la même souche (souche II) et les deux phages D 4/2 et T 5/0. Nous avons pensé, d'après les résultats donnés dans le chapitre précédent, que la dilution des lysats devait jouer un rôle très important dans l'évolution des cultures, et nous avons fait des expériences de deux types : l'une où l'on introduisait 1 cm³ de lysat de titre élevé dans 10 cm³ de milieu de culture, l'autre où les quantités de lysat introduites étaient sensiblement moins grandes.

Nous les désignerons, pour abréger, sous le nom d'expériences avec phage concentré et avec phage dilué.

I. — Expériences avec D 4/2 concentré

On introduit 1 cm³ de D 4/2 de titre $1{,}2 \times 10^9$ par cm³.

a) Tubes ensemencés avec 1.000 germes, soit 100 germes par cm³.

Après 3 heures	témoin	560 germes par cm³
	sensibles ..	110 — —
	résistants ..	0
Après 7 heures	témoin	20.000 germes par cm³
	sensibles ..	140 — —
	résistants ..	0
Après 24 heures	témoin	400.000.000 de germes par cm³
	sensibles ..	0
	résistants ..	20.000 germes par cm³

b) Tubes ensemencés avec 20.000 germes, soit 2.000 germes par cm³.

Après 4 heures	témoin	16.000 germes par cm³
	sensibles ..	90 — —
	résistants ..	10 — —
Après 24 heures	témoin	très poussé
	sensibles ..	0
	résistants ..	50.000 germes par cm³

c) Tubes ensemencés avec 200.000 germes, soit 20.000 germes par cm³.

Après 3 heures	témoin	140.000 germes par cm³
	sensibles ..	6.000 — —
	résistants ..	50 — —
Après 7 heures	témoin	opacité de 200.000.000 par cm³
	sensibles ..	8.000 germes par cm³
	résistants ..	500 — —

Après 24 heures, la culture qui a reçu le phage est très poussée et ne contient que des résistants.

d) Tubes ensemencés avec 2 millions de germes, soit 200.000 germes par cm³.

Après 4 heures	témoin	opacité de 100.000.000 par cm³
	sensibles ..	1.500 germes par cm³
	résistants ..	80 — —

Après 7 heures, le tube qui a reçu le phage commence à présenter une pousse visible. Après 24 heures, il n'y a plus que des résistants.

e) Tubes ensemencés avec 100 millions de germes, soit 10 millions par cm³.

Après 4 heures, la culture témoin paraît moins poussée, plus claire que celle qui a reçu le phage.

Témoin	$4{,}5 \times 10^7$ germes par cm³
Sensibles	5×10^7 — —
Résistants	1×10^7 — —

Après 7 heures, le tube qui a reçu le phage s'est éclairci, il est plus clair que le témoin, il y avait une lyse au moins partielle des germes sensibles.

A la suite de ces premiers essais, nous avons pensé qu'il serait intéressant de reprendre ces expériences en effectuant des titrages de germes toutes les heures, et de suivre l'évolution pendant vingt-quatre heures. Nous avons employé le phage D 4/2 titrant $2{,}1 \times 10^8$ par cm³.

Nous avons, en réalité, dans chaque essai, utilisé deux

expériences, l'une commencée le matin, l'autre mise en train le soir et observée le lendemain matin. En voici un exemple :

Essai effectué avec 100.000 germes, soit 10.000 par cm³.

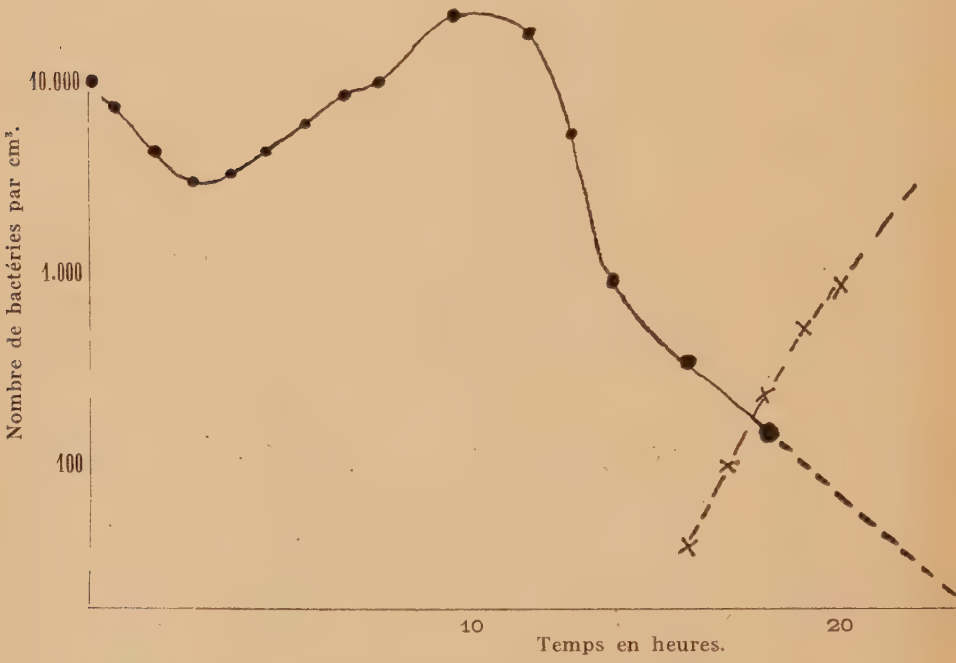
Temps	Sensibles	Résistants
1 h.	6.920 par cm³	0
2 h.	2.660 —	0
4 h.	2.180 —	0
5 h.	2.490 —	0
6 h.	3.200 —	0
7 h.	4.840 —	0
8 h.	6.000 —	0
11 h.	20.000 environ	0
12 h.	15.000 environ	0
13 h.	5.430 par cm³	0
14 h.	710 —	0
16 h.	320 —	27 par cm³
17 h.	360 —	70 —
18 h.	150 —	195 —
19 h.	?	414 —
20 h.	?	780 —
24 h.	0	16.000.000 —

Le titrage des bactéries sensibles étant fait par différence, il devient aléatoire quand le nombre des bactéries résistantes est notable, et celui des bactéries sensibles très petit. Aussi, celui-ci est-il ici indéterminé à partir de dix-neuf heures.

La courbe représentative de l'expérience est donnée ci-après.

Dans ces expériences, le phage D 4/2, bien qu'utilisé en grand excès, n'a presque jamais stérilisé complètement une culture de germes sensibles, si faible qu'ait été l'ensemencement.

Nous avons vu, par les étalements sur gélose, que la souche II paraît contenir beaucoup de résistants à D 4/2 : 1 p. 100, et on pourrait, à première vue, proposer une explication facile à cette absence de stérilisation. Mais cette explication ne tient pas, puisque nos observations démontrent que les bactéries qui restent « viables » sont en totalité ou en majorité des bactéries sensibles.



Légende. — Evolution d'une culture en présence de phages en grand excès (coordonnées semi-logarithmiques), les points correspondent aux bactéries sensibles, les croix aux bactéries résistantes.

Si l'on considère l'ensemble des faits observés, on peut dire que l'évolution de ces cultures en présence du phage D 4/2 concentré se fait en plusieurs stades. Il est assez rare qu'un ou plusieurs manquent. Nous reviendrons sur ces exceptions. Nous étudierons d'abord le cas général, celui d'une quantité moyenne de germes, où tous les stades se succèdent au complet.

Premier stade. — Lyse initiale. — Un nombre important de germes est rapidement lysé (lyse massive), mais deux phénomènes inattendus se produisent :

a) Certaines bactéries sensibles échappent toujours paradoxalement à l'action du phage. La lyse est partielle.

b) Celles-ci sont toujours peu nombreuses, quel que soit le nombre des bactéries présentes, tout au moins s'il ne dépasse pas 2 millions. Par conséquent, le nombre des survivants, quel que soit le nombre de bactéries ensemencées, est toujours à peu près du même ordre de grandeur. Bien que ne lysant jamais toutes les bactéries, une même quantité du même lysat détruit d'autant plus de bactéries qu'il y en a davantage dans le milieu.

Aussi, après trois heures, dans le tube contenant :

20.000 germes . .	19.000	ont été lysés
200.000 — . .	140.000	—
2.000.000 de germes.	1.984.000	—

Par contre, pour les quantités de germes très faibles ou très élevées, cette lyse initiale ne se produit pas.

Deuxième stade. — Bactériostase des germes sensibles survivants. — Pendant six à huit heures, le reliquat de germes sensibles reste à peu près constant.

Troisième stade. — Multiplication tardive des germes sensibles bactériostasés et deuxième lyse. — Cette multiplication, plus ou moins importante, ne dure pas très longtemps. La deuxième lyse suit très rapidement la multiplication tardive. Elle peut commencer alors que celle-ci n'est pas terminée. Pour ces deux raisons, cette multiplication est parfois difficile à mettre en évidence. Mais elle a été observée de façon incontestable quand on a pu suivre d'heure en heure l'évolution des cultures.

Quatrième stade. — Apparition et multiplication des résistants. — Ils apparaissent en grand nombre et très vite, après ou pendant la phase précédente. Souvent, pendant

plusieurs heures, ils ne se multiplient pas, paraissent subir à leur tour une bactériostase. Pendant ce temps, les dernières bactéries sensibles disparaissent (en général). Enfin, les résistants se multiplient, donnant une culture d'abondance égale, inférieure ou supérieure à la culture témoin et souvent agglutinée, alors que celle du témoin ne l'est pas.

L'évolution précédente concerne, répétons-le, les cas où le nombre des germes est moyen.

Les exceptions se voient quand les germes sont très peu nombreux ou très nombreux.

Dans le premier cas, le stade de lyse initiale est absent; on observe une bactériostase immédiate et totale de tous les germes, c'est ainsi que sur 1.000 germes ensemencés, aucun n'a été lysé au bout de trois heures. Cette bactériostase dure sept à huit heures, puis surviennent les troisième et quatrième stades, comme dans le cas général.

Dans le deuxième cas, la lyse initiale n'a pas pu être mise en évidence, et la culture paraît se développer comme la culture témoin et même plus vite, et la lyse survient ensuite. Les deux premiers stades manquent. C'est ainsi qu'après un ensemencement de 100 millions de germes, aucun n'a été lysé au bout de trois heures. Une lyse partielle survient plus tard.

Naturellement, quand le nombre de germes est très grand, ou la population très riche en résistants, les bactéries résistantes introduites modifient l'évolution; celles-ci se multiplient plus ou moins rapidement, mais il n'en est pas moins vrai que, quel que soit le nombre de germes, il y a toujours des bactéries sensibles qui restent longtemps en présence de phage sans être attaquées par lui.

II. — Expériences avec T 5/0 concentré

Le phage T 5/0 est employé à la dose de 1 cm^3, soit $4{,}5 \times 10^8$ phages.

Voici les résultats des expériences :

a) Tubes ensemencés avec 1.000 germes, soit 100 germes par cm³.

Après une heure, deux heures, trois heures, vingt-quatre heures et quarante-huit heures, on ne retrouve aucun germe dans le tube qui a reçu le phage, ces germes ont été lysés.

b) Tubes ensemencés avec 20.000 germes, soit 2.000 par cm³.

Nous devons envisager deux cas :

1° Après une heure, on retrouve 20 bactéries sensibles par cm³. Ensuite, on ne retrouve rien et on constate la stérilisation du milieu.

2° Dans les mêmes conditions, dans une autre expérience, après vingt-quatre heures, on retrouve 2.000 sensibles par cm³, et aucun résistant.

Après quarante-huit heures, la culture a bien poussé et la proportion est de 25 sensibles pour 5 résistants.

c) Tubes ensemencés avec 200.000 germes, soit 20.000 par cm³.

Dans ce cas, comme dans le précédent, on constate, soit une stérilisation dans les deux premières heures, soit une pousse retardée.

Le phage T 5/0 concentré a donc un pouvoir stérilisant pour la souche II beaucoup plus marqué que le D 4/2. Il lyse totalement, en une heure, dans tous les cas, 1.000 ou 2.000 germes.

Il peut encore lyser totalement, en deux heures au maximum, 20.000, 200.000 et 2 millions de germes.

Mais cette stérilisation est inconstante pour ces trois dernières quantités de germes.

Il est des cas où, après une lyse presque totale, on constate une bactériostase très prolongée des germes sensibles survivants, puis l'apparition de résistants qui se multiplient plus ou moins. L'évolution, dans ces cas, n'a pas été suivie

de bout en bout comme dans celui de D 4/2. Aussi, la phase de multiplication tardive des sensibles survivants, précédant l'apparition des résistants, n'a pas été mise en évidence. Il est probable qu'elle existe. On peut, dès maintenant, dire que, dans les cas où il n'y a pas stérilisation totale dès le début, l'évolution des cultures parcourt dans l'ensemble les mêmes stades qu'avec D 4/2, mais avec cette différence remarquable que sa durée est considérablement plus grande, surtout parce que la phase de bactériostase est beaucoup plus longue.

III. — Expériences avec D 4/2 dilué

Nous avons étudié cette action en nous plaçant dans deux conditions expérimentales différentes.

Nous avons mis en présence, dans un tube de 10 cm³ d'eau peptonée, un nombre égal de phages et de germes. Nous avons fait l'expérience en utilisant 200.000 germes de la souche II et 200.000 phages D 4/2 (lysat dilué dans ce cas à 10^{-5}). Un autre tube a reçu 1 cm³ de phage pur à titre comparatif. Les résultats sont les suivants :

Après 1 h. 30	+ phage dilué	sensibles . .	20.000 par cm³
		résistants . .	40 —
	+ phage pur	sensibles . .	1.000 —
		résistants . .	0 —
Après 4 h. . .	+ phage dilué	sensibles . .	20.000 par cm³
		résistants . .	150 —
	+ phage pur	sensibles . .	150 —
		résistants . .	60 —
Après 6 h. . .	+ phage dilué	sensibles . .	20.000 par cm³
		résistants . .	1.000 —
	+ phage pur	sensibles . .	1.000
		résistants . .	600 —

Dans cette expérience, le premier stade habituel de lyse

initiale a bien été observé avec le phage concentré, mais il paraît manquer complètement avec le phage dilué. Par contre, la bactériostase existait dans les deux cas, de sorte que le nombre de germes sensibles est resté à peu près constant dans les deux cas, au moins pendant les six premières heures (l'expérience n'a pas été poursuivie plus longtemps).

Notons que le nombre des résistants paraît plus grand, surtout au début, avec le phage dilué. Nous reviendrons plus loin sur ce point.

Discussion des résultats précédents

Nous avons dit, dans le chapitre précédent, qu'il ne semble pas que, dans les conditions de nos expériences, l'obstacle à la stérilisation soit dû dans tous les cas à la présence dès le début de bactéries résistantes (le cas de T 5/0 en est un exemple frappant). Nous constatons ici que, s'il y a des bactéries survivantes, une partie d'entre elles, au moins, sont des bactéries sensibles. Nos observations ont donc démontré que le sort des bactéries sensibles est la clé du problème, et cela que des bactéries résistantes soient ou non présentes.

On peut distinguer d'une façon générale deux types d'évolution. Dans le premier, une partie seulement des bactéries sensibles sont lysées par le phage, et la culture n'est jamais stérilisée; dans le deuxième, elles le sont toutes d'emblée, et la stérilisation est constante, si l'ensemencement n'a pas introduit de bactéries résistantes.

Dans le premier type, une lyse partielle initiale des bactéries sensibles se produit généralement. Dans quelques cas, cependant, nous ne l'avons pas mise en évidence, mais elle a pu échapper à l'observation. Les phases alternées de bactériostase et de lyse se succèdent ensuite, aboutissant finalement au développement d'une culture totalement résistante.

Dans le deuxième type, la lyse des bactéries sensibles est

d'emblée totale et définitive; la stérilisation de la culture est presque immédiate.

En somme, si la lyse n'est pas totale d'emblée, on n'observe jamais de stérilisation par la suite, quel que soit le retard observé au développement d'une culture. Par ailleurs, l'importance de ce retard dépend beaucoup de la race du phage. Avec T 5/0, la phase de bactériostase se prolonge généralement bien plus longtemps qu'avec D 4/2, de sorte que si l'on se borne à l'examen de l'opacité de la culture, on peut croire souvent, pendant vingt-quatre heures, quarante-huit heures, trois jours, que la stérilisation est complète. On a la surprise de voir se développer très tardivement une culture résistante.

Au total, le comportement de la souche II, vis-à-vis des deux phages D 4/2 et T 5/0 paraît très semblable dans ses grandes lignes. Les différences sont plutôt d'ordre quantitatif que qualitatif et portent sur deux points :

L'évolution du premier type est beaucoup plus lente avec T 5/0; en particulier, la phase de bactériostase se prolonge beaucoup plus longtemps.

Le second type est beaucoup plus fréquent avec T 5/0 qu'avec D 4/2.

Comment interpréter ces évolutions ?

En ce qui concerne le deuxième type d'évolution, il n'y a aucune difficulté : c'est la lyse en un temps d'une culture sensible par des phages en excès.

Au contraire, dans le premier type, plusieurs phénomènes sont inexplicables avec les notions que nous avons actuellement sur les phages et les mutants phago-résistants.

Trois surtout sont à souligner :

La survie d'un certain nombre de bactéries sensibles dans un milieu où existe une forte concentration de phages;

La bactériostase de ces bactéries sensibles survivantes;

L'apparition très rapide des résistants dès que leur multiplication reprend.

Nous avons entrepris d'étudier successivement ces trois

phénomènes. Nous donnerons brièvement les premiers résultats de ce travail, qui sera poursuivi.

A. — La survie de bactéries sensibles en présence de phages

Trois hypothèses peuvent être faites à ce sujet :

a) On peut supposer que les lysats contiennent des substances antiphages;

b) Que l'action des phages sur les bactéries ne peut se produire qu'avec l'association d'un facteur adjuvant venu des bactéries ou du lysat et qui se trouverait en quantité insuffisante dans les systèmes étudiés;

c) Enfin, les bactéries survivantes pourraient appartenir à une variété différente de celles des bactéries qui sont lysées, et opposer une certaine résistance à l'action du phage.

Ces hypothèses ne s'excluent pas mutuellement.

1° *Les lysats contiennent-ils des substances antiphages ?*

Cette hypothèse peut être éliminée pour deux raisons : il est impossible que le pouvoir antiphage de la même quantité de lysats soit d'autant plus faible qu'il y a moins de bactéries à lyser; par ailleurs, le nombre des bactéries sensibles survivantes n'est pas plus grand avec des lysats purs qu'avec des lysats dilués cent fois. Ceux-ci devraient apporter au système cent fois moins de ces hypothétiques substances antiphages. Au contraire, le nombre des bactéries survivantes, quand on emploie des lysats dilués, loin d'être diminué, est plus grand.

2° *Les phages n'agissent-ils qu'en association avec un facteur adjuvant venu des bactéries ?*

Cette hypothèse a plus de consistance que la précédente. En effet, nous avons vu qu'une même préparation de phages lyse d'autant plus de bactéries qu'on en a introduit davan-

tage dans la culture et, par ailleurs, on sait que, d'une façon générale, les phages se multiplient mieux quand ils sont introduits un certain temps après les germes, quand le métabolisme de ceux-ci est en pleine activité. De plus, nous avons vu précédemment que seuls les lysats concentrés peuvent stériliser des cultures, et il se pourrait que cette propriété soit due à leur forte concentration en substances adjuvantes plutôt qu'à leur titre élevé en phages.

Ce facteur pourrait provenir, soit du métabolisme normal des bactéries, soit de leur métabolisme modifié par l'induction spécifique du phage. Dans le premier cas, on devrait le trouver dans les milieux de culture où les bactéries se sont multipliées; dans le second, dans des lysats dont les phages ont été inactivés ou éliminés.

En ajoutant au système phages-bactéries diverses quantités de cultures de la souche II âgées de six heures à trente heures, centrifugées et filtrées à *p*H 7,8, nous n'avons jamais obtenu de lyse totale des bactéries sensibles.

Quelques essais ont été faits avec des lysats dont les phages étaient inactivés par du sérum spécifique. Ils ont été négatifs.

Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence, ni dans les milieux de culture, ni dans les lysats, de facteurs adjuvants qui permettraient la stérilisation des cultures de phage. Mais les essais sont insuffisants pour permettre une conclusion définitive, car les faits que nous venons de citer sont un argument sérieux en faveur de leur existence.

3° *Les bactéries survivantes opposent-elles une certaine résistance à l'action du phage ?*

Nous avons, dans tout ce qui précède, considéré comme bactéries « sensibles » toutes celles qui ne donnaient pas de colonies sur gélose en présence de bactériophage concentré.

Cette notion doit-elle subir des retouches ? On peut se demander si les bactéries de nos souches n'appartiennent

pas en totalité ou en partie au type décrit par R. Wahl et L. Blum-Emerique [32] sous le nom de « bactéries semi-résistantes ». Sur des souches contenant beaucoup de bactéries semi-résistantes à un phage, celui-ci donne des plages plus petites, moins nombreuses, parfois simultanément des plages de deux types différents. La fixation et la multiplication du phage sont plus difficiles.

Ces réactions sont bien celles de nos souches vis-à-vis des phages utilisés, en particulier de D 4 pour la souche II.

De plus, en repiquant plusieurs des colonies secondaires développées après la lyse par D 4/2 d'un étalement de la souche II sur gélose, on s'aperçoit que la subculture présente des plages ou des colonies irrégulières, preuves que le phage est actif au moins sur certaines de ces bactéries.

Enfin, si on isole, à partir de ces subcultures, une souche débarrassée de phage, et qu'on titre comparativement le phage D 4/2 et sur la souche II, on constate que ce phage donne environ 500 fois moins de plages sur la première. Il est probable que la souche II donne beaucoup moins de mutants semi-résistants à T 5/0 qu'à D 4/2, ce qui explique les différences d'action des deux phages.

Mais il faut également rendre compte des deux faits mentionnés dans le paragraphe précédent : le phage lyse d'autant plus de bactéries que la culture en contient davantage; seuls les lysats concentrés peuvent stériliser des cultures. Ces faits sont en accord avec la constatation que nous avons faite que la bactériolyse initiale manque complètement, quand le nombre de bactéries ensemencées est très petit ou quand le phage est très dilué.

Un facteur adjuvant paraît donc bien nécessaire pour lyser les bactéries sensibles et semi-résistantes, et ces dernières semblent en exiger une quantité plus élevée que les sensibles.

R. Wahl et J. Josse-Goichot [30, 31] ont décrit un *facteur bactériostatique* présent dans certains lysats et capable de

produire, en association avec le phage, la lyse de certaines bactéries. On peut en rapprocher les substances décrites par Sertic et Boulgakoff sous le nom de lysines [20, 21, 22 et 23].

Il serait intéressant de rechercher ce facteur bactériostatique dans nos lysats.

R. Wahl et ses collaborateurs ont montré, d'une part, qu'il y a plusieurs variétés de semi-résistants, différant par leurs réactions à un même phage et, d'autre part, que la richesse en facteur bactériostatique d'un lysat dépend de son mode de préparation. Ces faits pourraient peut-être expliquer les contradictions apparentes de nos expériences de stérilisation.

B. — La bactériostase des bactéries sensibles non lysées

On peut envisager, pour l'expliquer, soit l'intervention de facteurs bactériostatiques du lysat, soit une bactériostase par les phages eux-mêmes.

La première hypothèse était peu vraisemblable, car la bactériostase est aussi intense avec des lysats dilués qu'avec des lysats purs. Elle a été éliminée à la suite des expériences suivantes :

Nous avons ajouté à des lysats du sérum antiphage à raison de IV gouttes pour 10 cm^3 et, après un séjour de deux heures à l'étuve, nous avons constaté que les particules bactériophagiques étaient inactivées. Ces lysats étaient, soit simplement filtrés sur bougie L 3, soit précipités par $CaCl_2$ en présence de CO_3Na_2 puis filtrés. Ces lysats ne donnent plus aucune plage. Nous avons alors ajouté des quantités variables de ces lysats inactivés à des cultures ensemencées avec des quantités variables de germes. Nous avons suivi l'évolution de ces cultures parallèlement à des témoins, par numération des colonies sur plaques de gélose. Nous n'avons jamais constaté de bactériostase, et les cultures ont poussé

normalement. Cependant, au bout de vingt-quatre heures, on constatait que les germes qui avaient poussé étaient agglutinés, et l'opacité des cultures contenant les lysats inactivés était plus grande que celle des témoins. De plus, nous n'avons pas constaté d'augmentation du nombre des résistants par rapport à celui des témoins sous l'influence des lysats inactivés.

Nous voyons donc que les éléments du lysat autres que les phages ne semblent pas être les responsables de la bactériostase. Elle serait donc causée par les phages eux-mêmes.

On sait que le premier effet de la fixation des phages sur des bactéries sensibles est l'arrêt de la multiplication de celles-ci. La bactériostase par les phages est donc le premier temps normal de la bactériophagie, les temps suivants étant la multiplication des phages dans la bactérie et la lyse.

On peut se demander si, dans le cas présent, les deux autres temps ne pourraient se produire qu'avec l'aide du facteur adjuvant, dont nous avons supposé l'existence au paragraphe précédent.

Ainsi se trouverait expliqué également que l'étude de l'évolution des cultures nous ait fait constater un certain balancement entre la bactériostase et la lyse.

C. — L'apparition rapide des résistants a la fin de l'évolution

La question de l'origine des bactéries résistantes a été longtemps discutée : les uns les considéraient comme issues de mutations indépendantes de l'action du phage, les autres comme résultant d'une transformation des bactéries résistantes en bactéries sensibles, sous l'action du phage.

Les travaux de Luria et Delbruck, de Demerec et Fano ont démontré que, dans les conditions de leurs expériences, il s'agissait de mutations.

En est-il de même dans notre cas ? Le fait que les résis-

tants apparaissent après une phase de multiplication des bactéries sensibles survivantes est en faveur de cette interprétation. Cependant, cette multiplication dure peu, les résistants apparaissent très rapidement en grand nombre.

De nouvelles recherches seraient nécessaires pour résoudre cette question.

RÉSUMÉ - CONCLUSIONS

Il ressort des travaux antérieurs que la valeur thérapeutique des bactériophages est très discutable. L'expérimentation n'a enregistré que de rares succès, d'ailleurs très limités et concernant des infections de la souris par des bactéries peu pathogènes pour cet animal. C'est pourquoi nous avons choisi pour nos recherches l'infection expérimentale de la souris par un germe très pathogène : *Salmonella enteritidis*, var. Danysz.

I. — Nous avons employé *plusieurs souches* de cette bactérie et *plusieurs phages*.

1° *Les souches* diffèrent entre elles par leurs réactions aux phages (nombre et caractères des plages, conditions de multiplication) et par leur pouvoir pathogène.

Elles présentent, à ce double point de vue, une grande variabilité due à la fréquence des mutations au cours des repiquages.

2° *Les phages*, de leur côté, acquièrent des propriétés différentes suivant les souches sur lesquelles ils ont été multipliés.

3° Nos expériences ayant montré qu'il importait de travailler avec des lysats de *titre élevé* et, autant que possible, *purifiés*, nous nous sommes efforcé de réaliser ces conditions.

En particulier, nous avons établi la formule d'un milieu semi-synthétique (contenant de l'hydrolysat de caséine et

du tryptophane) qui nous a donné de bons rendements en phages.

4° Nos essais de purification et de concentration des phages, en adaptant la méthode de R. Wahl et ses collaborateurs, ont donné des résultats encourageants, mais n'ont pas pu être poussés assez loin pour être appliqués à la préparation des lysats utilisés dans le présent travail.

II. — *L'expérimentation sur la souris* a donné les résultats suivants :

1° Les phages *peuvent se multiplier* dans le sang des souris infectées, mais seulement dans certaines conditions, portant en particulier sur les proportions respectives de phages et de germes. Dans les autres cas, le nombre de phages du sang diminue souvent plus vite que chez les témoins qui n'ont pas reçu de germes.

2° Les lysats bactériophagiques de *Salmonella enteritidis*, var. Danysz, *peuvent être toxiques*, probablement parce que la lyse met en liberté l'endotoxine de Boivin. De tels lysats, après concentration par l'alcool, tuaient les souris en quinze minutes, avec des symptômes nerveux. Mais la toxicité dépend de la souche qui a servi à préparer le lysat. Nous avons toujours utilisé une souche (souche II) dont les lysats ne sont pas toxiques. On pourrait aussi préparer les lysats sur une espèce bactérienne peu pathogène pour la souris, par exemple *S. typhi*.

3° Après avoir établi la dose mortelle des différentes souches et la symptomatologie de l'infection chez la souris, nous avons pratiqué des *essais thérapeutiques* en injectant, par voie intrapéritonéale, les bactéries et, aussitôt après, des quantités élevées de différents phages, par la même voie. Dans certains cas, les injections de phages étaient renouvelées. Nous n'avons enregistré que des échecs.

Nous en avons cherché l'explication dans l'étude de

l'évolution des germes en présence de phages *in vivo* et *in vitro*.

4° Chez les souris ayant reçu une dose faible ou moyenne de bactéries et de phages, *les bactéries apparaissent dans le sang*, soit plus tôt, soit en même temps (au bout de quarante-huit heures) que chez celles qui n'ont reçu que des germes. Si la souris résiste à cette première poussée, l'évolution est identique chez les souris traitées et chez les témoins : évolution continue de la septicémie ou disparition momentanée des germes du sang, suivie de poussée terminale mortelle. Chez les souris traitées, les germes sont alors généralement résistants, mais on peut voir réapparaître, à la fin, des germes sensibles.

Le fait important est qu'une partie des germes sensibles échappe à l'action du phage.

III. — 1° Nous retrouverons souvent *in vitro* cette *survie de germes sensibles* en présence du phage, mais ici on peut observer parfois *la stérilisation d'une culture*. Celle-ci est rare, cependant, et possible seulement sous certaines conditions.

a) Elle n'a été observée qu'avec des lysats préparés avec certaines races de phages et certaines souches (phages D 4/2 et T 5/0).

b) Le lysat ne doit pas être trop dilué dans le milieu (pas plus de 1/100e).

c) Le nombre de germes doit être peu élevé (moins de 200.000).

Remarquons que la concentration du lysat doit être d'autant plus grande qu'il y a plus de germes à stériliser.

Avec des mélanges de phages, on obtient, suivant leur composition, une amélioration, une diminution du pouvoir stérilisant, ou aucun changement.

Sur gélose, l'effet stérilisant des phages paraît généralement plus intense, tant avec un seul phage qu'avec des mélanges de phages.

2° L'évolution des cultures, en présence de phages, peut se faire suivant deux types différents :

Dans le premier type, il n'y a jamais de stérilisation.

On observe généralement *quatre stades* (pour une quantité moyenne de bactéries avec un lysat concentré) : lyse partielle initiale; bactériostase des germes sensibles survivants; multiplication tardive de ceux-ci et seconde lyse partielle; apparition et multiplication des résistants.

Quand le nombre de bactéries est très grand ou très petit, le premier stade manque. Il en est de même quand le lysat est assez dilué.

Dans le deuxième type, il y a toujours stérilisation, elle est très rapide et totale d'emblée.

Quelques particularités distinguent l'une de l'autre *l'action des phages D 4/2 et T 5/0.*

Avec D 4/2, on observe presque toujours le premier type dont les quatre stades sont parcourus assez rapidement (en vingt-quatre heures). Le deuxième type est exceptionnel avec ce phage.

Avec T 5/0, l'évolution du premier type est sensiblement plus lente. Le deuxième type est plus fréquent qu'avec D 4/2.

Trois faits remarquables sont à souligner dans l'évolution du premier type. Nous allons les indiquer avec, pour chacun, l'explication qui nous paraît actuellement la plus vraisemblable.

a) Le premier fait est la *survie de bactéries sensibles en présence de phages.* Elle n'est pas due à des substances antiphages. L'hypothèse que nous retenons est que les bactéries bactériostasées sont du type « semi-résistant » décrit par R. Wahl et L. Blum-Emerique, et qu'un facteur adjuvant est nécessaire pour réaliser l'action du phage sur ces bactéries. Ce facteur se trouverait en quantité insuffisante dans le système. Il serait un produit du métabolisme bactérien normal ou modifié par les phages. Ceci expliquerait que,

dans le premier type d'évolution, bien que la lyse n'y soit jamais totale, le nombre des bactéries lysées augmente avec l'importance de l'ensemencement.

b) Le second fait est la *bactériostase des bactéries sensibles* (ou semi-résistantes) non lysées. Elle paraît due aux phages eux-mêmes et non à d'autres facteurs du lysat.

c) Le troisième fait est l'apparition rapide *des résistants* à la fin de l'évolution. Elle paraît en rapport avec la multiplication tardive des bactéries semi-résistantes survivantes.

Au total, il est presque aussi aléatoire de stériliser une culture par les phages que de guérir par ceux-ci une infection, et, pour les mêmes raisons, un certain nombre de bactéries sensibles ou semi-résistantes échappe à l'action du phage, probablement parce que certains facteurs adjuvants du phage sont en quantité insuffisante dans les systèmes considérés.

Les expériences faites *in vitro* montrent, de plus, que les chances de réussite sont cependant plus grandes avec certaines races de phages utilisées à forte concentration.

Il n'est peut-être pas défendu d'espérer qu'en partant des quelques résultats que nous avons obtenus, des recherches ultérieures pourraient amener quelques progrès nouveaux dans la solution de ces problèmes extrêmement complexes.

Vu :
Le Doyen,
G. PORTMANN.

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
R. SIGALAS.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 2 Juin 1950.
Le Recteur.
E. DELAGE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Asheshov (I. N.), Wilson (J.) & Topley (W. W. C.). — The effect of an anti Vi bacteriophage on typhoid infections in mice. *Lancet*, 1937, **1**, 319.
2. Boivin (A.) et Mesrobeanu (I. et L.). — Extraction d'un complexe toxique et antigénique à partir du Bacille d'Aertrycke. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 307.
3. Boivin (A.) et Mesrobeanu (L.). — Remarques concernant la technique d'extraction du complexe polysaccharidique antigénique renfermé dans le Bacille d'Aertrycke. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 304.
4. Boivin (A.) et Mesrobeanu (L.). — Sur les propriétés chimiques d'une substance toxique et immunisante isolée du Bacille d'Aertrycke. *C. R. Acad. Sc.*, 1934, **198**, 2211.
5. Demerec (M.) & Fano (U.). — Bacteriophage resistant mutants in E. coli. *Genetics*, 1945, **30**, 119.

5bis. Delbrück (M.). — Experiments with bacterial viruses (Bacteriophage). *The Harvey Lectures Series*, 1945-1946, **41**, 166.

6. Dubos (R. J.), Straus (J. H.) & Price (C.). — The multiplication of bacteriophage in vivo and its protective effect against an experimental infection with *Shigella dysenteriæ*. *J. Exp. Med.*, 1943, **78**, 161.
7. Fisk (R. T.). — Protective action of typhoid phage on experimental typhoid infection in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1938, **38**, 659.
8. Gladstone (G. P.) & Fildes (P.). — A simple culture medium for general use without meat extract or peptone. *Brit. J. Exp. Path.*, 1940, **21**, 161.
9. Krueger (A. P.) & Scribner (E. J.). — The bacteriophage. Its nature and its therapeutic use. *J. Am. Med. Ass.*, 1941, **116**, 2160-2269.
10. Morton (H. E.) & Engley (F. B.). — Protective action of dysentery bacteriophage in experimental infections in mice. *J. Bact.*, 1944, **47**, 475.

11. Morton (H. E.) & Engley (F.-B.). — Dysentery bacteriophage. Review of the litterature on its prophylactic and therapeutic uses in man and in experimental infections in animals. *J. Am. Med. Ass.*, **127**, 584.

12. Morton (H. E.) & Perez-Otero (J. E.). — The generation of dysentery bacteriophage in vivo during experimental infection in mice. *J. Bact.*, 1944, **47**, 475.

13. Morton (H. E.) & Engley (F. B.). — The protective action of dysentery bacteriophage in experimental infections in mice. *J. Bact.*, 1945, **49**, 245.

14. Morton (H. E.) & Perez-Otero (J. E.). — The increase of bacteriophage in vivo during experimental infections with *Shigella paradysenteriæ*, Flexner, in mice. *J. Bact.*, 1945, **49**, 237.

15. Larrimore (O. M.) & Harris (W. H.). — Action of the bacteriophage in experimental typhoid peritonitis. *Proc. Exp. Biol. Med.*, 1928-1929, **26**, 754.

16. Lévy (M. M.). — Essai d'immunisation contre la typhose des souris. Essai de protection de la souris contre la typhose murine par le bactériophage. *C. R. Soc. Biol*, 1925, **93**, 82, 395 et 396.

17. Luria (S.) & Delbruck (M.). — Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 1943, **28**, 491.

18. D'Herelle. — Le bactériophage et son comportement, 1 vol. Masson, édit., 1926.

19. Richet (Fils) et Haudurcy (P.). — Essais d'immunisation contre la typhose des souris avec le bactériophage de d'Hérelle. *C. R. Soc. Bol.*, 1925, **93**, 222.

20. Sertic (V.) et Boulgakoff (N.). — Sur l'examen de la polyvalence des bactériophages et de leurs lysines. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 442.

21. Sertic (V.) et Boulgakoff (N.). — Lysines de bactériophages présentant différentes thermo-résistances. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 948.

22. Sertic (V.). — Agglutination microbienne et lysine du bactériophage. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 780.

23. Sertic (V.) et Boulgakoff (N.). — Sur l'action bactéricide du bactériophage. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123**, 778.

24. Wahl (R.). — Influence de la composition du milieu sur la bactériophagie. *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **73**, 73.

25. Wahl (R.), Grabar (P.), Rouyer (M.) et Blum-Emerique (L.). - Purification des bactériophages. I. Adsorption des protéides sur un précipité de phosphate de calcium. *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 682.

26. Wahl (R.), Grabar (P.) et Blum-Emerique (L.). — Considérations sur la conservation et l'adsorption des bactériophages. (Congrès de Chimie biologique de Liège, 30 octobre 1946.) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 321.

27. Wahl (R.) et Blum-Emerique (L.). — Purification et concentration du bactériophage. II. Précipitation par l'éthanol et redissolution des phages. Essais divers. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 103.

28. Wahl (R.) et Blum-Emerique (L.). — Calcium et phosphate dans la multiplication des bactériophages. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 137.

29. Wahl (R.) et Blum-Emerique (L.). — Thymol, bactéries et bactériophage. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 561.

30. Wahl (R.) et Josse-Goichot (J.). — Bactériostase et bactériolyse de bactéries dites phago-résistantes par les lysats bactériophagiques riches en produits bactériens. *C. R. Acad. Sc.*, 1950, **230**, 1225.

31. Wahl (R.) et Josse-Goichot (J.). — Le facteur bactériostatique des lysats bactériophagiques. *C. R. Acad. Sc.*, 1950, **230**, sous presse.

32. Wahl (R.) et Blum-Emerique (L.). — Le cycle biologique et les exigences biochimiques des systèmes phago-bactériens en fonction de certaines mutations bactériennes. Communication à la Soc. franç. des Microbiologistes, séance d'avril 1950; in *Ann. Inst. Pasteur*, sous presse.

33. Wahl (R.) et Terrade (A.). — Evolution et conditions de stérilisation des cultures bactériennes en présence de bactériophages. Communication à la Soc. franç. des Microbiologistes, séance du 1er juin 1950; in *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, sous presse.

34. Wahl (R.), Terrade (A.) et Monceaux (G.). — Préparation de lysats bactériophagiques de titre élevé. Purification et concentration des bactériophages par deux adsorptions successives sur phosphate de calcium. Communication à la Soc. franç. de Microbiologie, séance de juillet 1950; in *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, sous presse.

35. Wahl (R.) et Terrade (A.). — Multiplication des bactériophages et des bactéries chez les souris infectées par *Salmonella enteritidis*, var. Danysz. Communication à la Soc. franç. de Microbiologie, séance du 1er juin 1950; in *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, sous presse.

36. Wahl (R.) et Terrade (A.). — Libération de l'antigène glucidolipidique de *Salmonella enteritidis*, var. Danysz, par la lyse bactériophagique. Communication à la Soc. franç. de Microbiologie, séance de juillet 1950; in *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, sous presse.

37. Ward (W.). — Therapeutic use of specific typhoid bacteriophage. *J. Bact.*, 1946, **51**, 619.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 3

HISTORIQUE 5

PREMIÈRE PARTIE

Etude des souches bactériennes et des phages 11

CHAPITRE PREMIER. — ETUDE DES SOUCHES 11

CHAPITRE II. — ETUDE DES PHAGES 16

CHAPITRE III. — ETUDE DE LA COMPOSITION DU MILIEU POUR LA PRODUCTION OPTIMA DU PHAGE D 4 SUR S. DANYSZ 22

CHAPITRE IV. — ESSAIS DE PURIFICATION ET DE CONCENTRATION DES PHAGES 27

DEUXIÈME PARTIE

Expérimentation sur la Souris 35

CHAPITRE PREMIER. — TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE. ELIMINATION ET MULTIPLICATION DU PHAGE « IN VIVO » 35

CHAPITRE II. — TOXICITÉ DE CERTAINS LYSATS 43

CHAPITRE III. — DOSES MORTELLES. — SYMPTOMATOLOGIE. ESSAIS THÉRAPEUTIQUES 47

CHAPITRE IV. — EVOLUTION DES GERMES CHEZ LA SOURIS AYANT REÇU DES INJECTIONS DE PHAGES 51

TROISIÈME PARTIE

Comportement des germes dans les cultures en présence des phages 59

CHAPITRE PREMIER — CONDITIONS DE LA STÉRILISATION D'UNE CULTURE PAR LES PHAGES 60

CHAPITRE II. — EVOLUTION DES CULTURES EN MILIEU LIQUIDE EN PRÉSENCE DE PHAGES 70

RÉSUMÉ. — CONCLUSIONS 87

BIBLIOGRAPHIE 93

Bordeaux. — Imp. E. DROUILLARD, 3, place de la Victoire.